

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P. DE ODONTOLOGÍA

**“EFECTOS ANTIBACTERIANOS DE LAS
COMBINACIONES ALTERNATIVAS DE LA DROGA
3MIX Y MP SOBRE BACTERIAS PREVALENTES EN
NECROSIS PULPAR”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Sheyla Marilis Bravo Jaimes

ASESOR

Dr. C.D. María Angélica Alvarez Páucar

Lima-Perú

2015

JURADO DE SUSTENTACIÓN

PRESIDENTE: Mg. Blg° Gilberto Alejandro Mendoza Rojas

MIEMBRO: C.D. María Soledad Ventocilla Huasupoma

MIEMBRO ASESOR: Dr. C.D. María Angélica Alvarez Páucar



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
UNIDAD DE ASESORIA Y ORIENTACIÓN DEL ESTUDIANTE



ACTA

Los Docentes que suscriben, reunidos el veintitrés de octubre del 2015, por encargo de la Sra. Decana de la Facultad, con el objeto de constituir el Jurado de Sustentación para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista de la Bachiller:

BRAVO JAIMES, Sheyla Marilis

CERTIFICAN :

Que, luego de la Sustentación de la Tesis « **EFFECTOS ANTIBACTERIANOS DE LAS COMBINACIONES ALTERNATIVAS DE LA DROGA 3MIX Y MP SOBRE BACTERIAS PREVALENTES EN NECROSIS PULPAR** » y habiendo absuelto las preguntas formuladas, demuestra un grado de aprovechamiento: SOBRESALIENTE siendo calificado con un promedio de: VEINTE 20

(en letras)

(en números)

En tal virtud, firmamos en la Ciudad Universitaria, a los veintitrés días del mes de octubre de dos mil quince.

PRESIDENTE DEL JURADO

Mg. Blg°. Gilberto Alejandro Mendoza Rojas

MIEMBRO

C.D. María Soledad Ventocilla Huasupoma

MIEMBRO (ASESOR)

Dra. C.D. María Angélica Álvarez Páucar

Escala de calificación: Grado de Aprovechamiento:
Sobresaliente (18-20), Bueno (15-17), Regular (12-14), Desaprobado (11 ó menos)
Criterios: Originalidad, Exposición, Dominio del Tema, Respuestas.

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y guiarme fielmente por el camino de la vida.

A mi familia, que me han brindado todo su apoyo y ejemplo para llegar hasta donde estoy, siendo el soporte necesario para mi desarrollo. Siempre son un verdadero apoyo en cada aventura que decido emprender, y espero que lo sigan siendo...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a todas las personas que con su colaboración hicieron posible el desarrollo del presente trabajo de investigación.

- A mi asesora Dr.C.D. María Angélica Álvarez Páucar, Docente de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su invaluable apoyo y confianza depositada en mí desde un inicio.
- Mg.Blg. Alejandro Mendoza Rojas y C.D. María Ventocilla Huasupoma por formar parte de mi jurado asesor y revisor del presente trabajo, por su apoyo y orientación.
- Dr.Blg. Marío Julio Ávila Campos, Profesor responsable del Laboratorio de Anaerobios del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, por sus importantes sugerencias, ayuda y gran apoyo durante la ejecución del proyecto.
- Mg.Blg. Hilda Moromi Nakata, Docente de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su apoyo y sugerencias durante la ejecución del proyecto.
- Mg.C.D. Cecilia Rodríguez Vargas, Docente de estadística de la Facultad de Odontología de la UNMSM por su apoyo y orientación en la parte estadística.
- Ph. D. Angie Quispe Salcedo, Post doctora en la Universidad de New York, por su valiosa colaboración sin fronteras desde el inicio del proyecto.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Anaerobios del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo por su ayuda durante la ejecución de este proyecto.
- Al personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por su colaboración durante la ejecución del proyecto.
- A mis amigos, por estar siempre presentes.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano de la combinación de droga 3Mix y MP y de sus combinaciones alternativas contra *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Se empleó el método de dilución en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) y método de difusión en agar modificado para determinar el efecto antibacteriano de los vehículos. Se emplearon dos cepas ATCC *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*, con la combinación de componentes de la droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor(reemplazo de minociclina por cefaclor) y 3Mix-Amoxicilina(reemplazo de minociclina por cefaclor) en las siguientes concentraciones: 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56µg/ml; 0,39µg/ml; 0,195µg/ml; 0,097µg/ml y macrogol(M), propilenglicol(P) y su asociación. La CIM para 3Mix, 3Mix-cefaclor fue 0,39µg/ml y 0,195µg/ml para 3Mix-Amoxicilina mientras que CBM fue >25µg/ml; 25µg/ml; 6,25µg/ml respectivamente sobre *Enterococcus faecalis*, para *Fusobacterium nucleatum* la CIM de 3Mix, 3Mix-Cefaclor fue 0,195µg/ml y ≤0,097µg/ml para 3Mix-Amoxicilina, los cuales coincidieron con CBM. Se obtuvo inhibición de crecimiento bacteriano por parte macrogol y propilenglicol+macrogol, sin embargo propilenglicol no formó halo de inhibición sobre *Enterococcus faecalis* ni *Fusobacterium nucleatum*. La Combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina presentaron efectos antibacterianos contra *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Palabras claves: *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, efecto antibacteriano, Concentración inhibitoria mínima, Concentración bactericida mínima.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the antibacterial effect of the combination of drug 3Mix and MP and its alternative combinations against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. Broth dilution assay was used to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) and modified agar well diffusion assay method was used to determine the antibacterial effect of agar vehicles. Were used *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* from ATCC, with combination of components of drug 3Mix, 3Mix-Cefaclor(replacement of Minocycline by Cefaclor) and 3Mix-Amoxicillin (replacement of Minocycline by Amoxicillin) in concentrations: 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56µg/ml; 0,39µg/ml; 0,195µg/ml; 0,097µg/ml and macrogol(M), propilenglicol(P) and their association. The MIC for 3Mix, 3Mix-cefaclor was 0,39µg/ml and 0,195µg/ml for 3Mix-Amoxicillin while CBM was >25µg/ml; 25µg/ml; 6,25µg/ml respectively against *Enterococcus faecalis*. For *Fusobacterium nucleatum* the CIM of 3Mix, 3Mix-Cefaclor was 0,195µg/ml and ≤0,097µg/ml for 3Mix-Amoxicillin, which coincided with CBM. Inhibition of bacterial growth was obtained by polyethylene glycol and propyleneglycol + polyethyleneglycol, however propyleneglycol did not generate inhibition zone on *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. The three drug combination 3Mix, 3Mix-Cefaclor and 3Mix-Amoxicillin presented antibacterial effects against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, antibacterial effect, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

CONTENIDO		Páginas
I.	INTRODUCCIÓN	16
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	
	2.1 Área problema	17
	2.2 Delimitación	18
	2.3 Formulación	19
	2.4 Objetivos	19
	2.5 Justificación	20
	2.6 Limitaciones	21
III.	MARCO TEÓRICO	
	3.1 Antecedentes	21
	3.2 Bases teóricas	28
	3.3 Definición de términos	58
	3.4 Hipótesis	59
	3.5 Operacionalización de variables	59
IV.	METODOLOGIA	
	4.1 Tipo de investigación	60
	4.2 Población y muestra	60
	4.3 Procedimientos y técnica	61
	4.4 Procesamiento de datos	66
	4.5 Análisis de resultado	67
V.	RESULTADO	
	5.1 Determinación de la concentración inhibitoria mínima de combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina frente a <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	68
	5.2 Determinación de la concentración bactericida mínima de combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina frente a <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	74

5.3	Efecto antibacteriano de vehículos sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i>	80
5.4	Tablas y gráficos de resultados	82
VI.	DISCUSIÓN	96
VII.	CONCLUSIONES	100
VIII.	RECOMENDACIONES	101
IX.	BIBLIOGRAFIA	102
X.	ANEXOS	110

LISTA DE FIGURAS

Fig. N°. 1.- Estadio de brote o yema	29
Fig. N°. 2.- Estadio de casquete	30
Fig.N°. 3.- Estadio de campana	32
Fig. N°. 4.- Raíz 2/3	34
Fig. N°. 5.- Raíz 2/3	35
Fig. N°. 6.- Raíz $\frac{3}{4}$	35
Fig. N°. 7.- Raíz completa	35
Fig. N°. 8.- Raíz con cierre especial	35
Fig. N°. 9.- Tubos de <i>Enterococcus faecalis</i> en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6, 25 µg/ml; 1, 56 µg/ml; 0, 39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/m)	68
Fig. N°. 10.- Tubos de <i>Enterococcus faecalis</i> en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).	69

Fig. N°. 11.- Tubos de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).

70

Fig. N°. 12.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).

71

Fig. N°. 13.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).

72

Fig. N°. 14.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).

73

Fig. N°. 15.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml.

74

Fig. N°. 16.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml.

75

Fig. N°. 17.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml. 76

Fig. N°. 18.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39µg/ml; 0,195 µg/ml. 77

Fig.N°. 19.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml. 78

Fig. N°. 20.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097 µg/ml. 79

Fig.N°. 21.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* con macrogol, propilenglicol y su combinación. 80

Figura N°. 22.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* con macrogol, propilenglicol y su combinación. 81

LISTA DE TABLAS

Tabla Nº 1.- Componentes de La mezcla poliantibiótica (3Mix-MP)	53
Tabla Nº 2.- Cultivo de cepas bacterianas ATCC	63
Tabla Nº 3.- Determinación de concentración inhibitoria de droga 3Mix sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	82
Tabla Nº 4.- Determinación de concentración inhibitoria de droga 3Mix-Cefaclor sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	83
Tabla Nº 5.- Determinación de concentración inhibitoria de droga 3Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	84
Tabla Nº 6.- Comparación de concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	85
Tabla Nº 7.- Halos de inhibición de vehículos sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N°1.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	87
Gráfico N°2.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	88
Gráfico N°3.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix-Cefaclor sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	89
Gráfico N°4.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix-Cefaclor sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	90
Gráfico N°5.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	91
Gráfico N°6.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	92
Gráfico N°7.- Comparación entre el efecto antibacteriano de droga 3Mix, 3 Mix-Cefaclor, 3 Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> .	93
Gráfico N°8.- Comparación entre el efecto bactericida de droga 3Mix, 3 Mix-Cefaclor, 3 Mix-Amoxicilina sobre <i>Enterococcus faecalis</i> .	94
Gráfico N°9.- Medias de distribución de datos de Halos de inhibición de vehículos Propilenglicol, Macrogol y Propilenglicol+Macrogol sobre <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	95

LISTA DE ANEXOS

Anexo N°1.- FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°1	111
Anexo N°2.- FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°2	112
Anexo N°3.- Procedimiento de obtención de drogas	113
Anexo N°4.- Obtención de material biológico	115
Anexo N°5.- Preparación del medio de cultivo (TSB)	116
Anexo N°6.- PROCEDIMIENTOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA	117
Anexo N°7.- PROCEDIMIENTOS DE SUSCEPTIBILIDAD DE VEHÍCULO	119

I. INTRODUCCIÓN

El tratamiento de los dientes permanentes jóvenes con necrosis pulpar y la enfermedad periapical presenta muchos desafíos para la Odontología ya que al no completar su desarrollo apical las paredes de sus raíces son frágiles, delgadas, divergentes y presentan ápices abiertos⁽¹⁾. Siendo la apexificación el tratamiento endodóntico convencional para este tipo de casos, los cuales han incluido el uso del hidróxido de calcio o agregado trióxido mineral (MTA).^{(2),(3)} Tanto el hidróxido de calcio como el MTA sirven para lograr un tope apical, para luego facilitar la obturación del conducto radicular y obtener la resolución de la lesión periapical, sin embargo el diente permanente joven sigue siendo frágil, con paredes radiculares delgadas, y más susceptible a fracturas.⁽⁴⁾

Actualmente, se viene usando la revascularización como alternativa de tratamiento⁽⁴⁾, la cual consiste en la regeneración del complejo dentino-pulpar sano y permitirá la maduración continua de la raíz y engrosamiento de las paredes dentinales⁽⁵⁾ para lo cual un requisito indispensable es eliminar la infección de los conductos radiculares infectados sin instrumentación mecánica⁽⁶⁾. Dentro de los cuales se han identificado principalmente a *Porphyromonas endodontalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*. En los últimos años se ha venido utilizando la combinación de droga 3Mix-MP para la desinfección de conductos radiculares en procedimientos de revascularización, la cual consiste en la mezcla de ciprofloxacino, metronidazol, minociclina y vehículos macrogol y propilenglicol.^{(7),(8),(9),(10),(11)} Esta combinación ha demostrado ser altamente eficaz en comparación del uso individual de cada componente,⁽¹²⁾ sin embargo diversos estudios no precisan la concentración exacta de droga a emplear en la actividad clínica. Se ha encontrado cambio de coloración de la corona dental como desventaja en su uso, debido a la minociclina que presenta en su composición.^{(7),(13)}

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano de la combinación de droga 3Mix y MP y de sus combinaciones alternativas contra *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Área problema

Las lesiones pulpares en piezas permanentes jóvenes (Ápices abiertos) siguen siendo un desafío en la Odontología. La causa más común de la necrosis de la pulpa de dientes permanentes jóvenes es la caries dental o los traumatismos, causando así cuadros de necrosis pulpar y periodontitis apical.^{(14),(15)} Ante estos casos el tratamiento indicado es el procedimiento de la apexificación con hidróxido de calcio o apexificación inmediata con mineral trióxido agregado (MTA)^{(2),(3)}. Un problema importante de la realización de una apicoformación con hidróxido de calcio es el largo período de tratamiento, además se ha reportado que el tratamiento con hidróxido de calcio a largo plazo puede alterar las propiedades de la dentina^(16, 17). El uso de MTA permite crear una barrera artificial en la parte apical de la raíz, la cual se ha demostrado ser eficaz. Tanto el hidróxido de calcio como el MTA sirven para lograr un tope apical en procedimientos de apexificación, para luego facilitar la obturación del conducto radicular con gutapercha en sus 3 dimensiones para finalmente obtener la resolución de la lesión periapical, sin embargo el diente permanente joven sigue siendo frágil, ya que la raíz sigue siendo corta, con paredes radiculares delgada, siendo más susceptible a fracturas. En la actualidad se viene usando la revascularización⁽⁴⁾ como alternativa de tratamiento para dientes inmaduros necrosados, la cual consiste en la regeneración del complejo dentino-pulpar sano que permitirá la maduración continua de la raíz, es decir crecimiento de la raíz y engrosamiento de las paredes dentinales y apexificación natural⁽⁵⁾. Un requisito obligatorio para lograr el éxito de los procedimientos regenerativos es

eliminar la infección intrarradicular, ya que la reparación apical no se producirá en presencia de tejido infectado y en vista de que no está indicado realizar la instrumentación de los canales radiculares para no alterar con el barro dentinario producido a las proteínas de factores de crecimiento endógenos presentes en las paredes radiculares; siendo estas proteínas las que señalizaran a las células madres mesenquimales para su futura diferenciación,⁽¹⁸⁾ por todo eso generalmente se coloca una pasta 3Mix-MP como medicación intracanal durante el procedimiento regenerativo^{(7),(8), (9), (10), (11)}

2.2 Delimitación

La pasta 3mix-MP, introducida inicialmente por Hoshino, consiste en la combinación de los antibióticos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina con los vehículos macrogol y propilenglicol, han demostrado eliminar las bacterias presentes en las lesiones pulpares de forma eficaz en comparación del uso individual de cada componente⁽¹²⁾ mediante la colocación de dicha pasta a nivel de las cámaras pulpares o diseñando cavidades de medicación según el diagnóstico pulpar.⁽⁹⁾

Se ha identificado principalmente *Porphyromonas endodontalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis* como parte de la composición microbiana de los conductos radiculares infectados de dientes permanentes jóvenes (Ápices abiertos)⁽¹⁹⁾, siendo esta última una de las bacterias de mayor importancia debido a que está presente en infecciones resistentes a tratamientos apicales.⁽⁵⁾ Sin embargo, existe controversia entre algunos autores como Trope⁽¹⁵⁾, Thomsom⁽¹³⁾, Thibodeau⁽²⁰⁾ que indican como una desventaja en el uso de la pasta, a la decoloración de la corona del diente, debido a la acción de los complejos insolubles que se forman al unirse los iones Ca^{+2} y la minociclina que presenta esta pasta en su

composición.^{(7),(13)} Por esta razón, algunos investigadores optan por realizar algunas variaciones en la mezcla de la pasta 3Mix-MP original para evitar este efecto adverso en los dientes permanentes jóvenes, sustituyendo a la minociclina por otros antibióticos, como cefaclor, amoxicilina o por su omisión.^{(14),(15) (13),(20)}

2.3 Formulación

¿Será efectiva la combinación de droga 3Mix y MP y de sus combinaciones alternativas sobre bacterias prevalentes en necrosis pulpar?

2.4 Objetivos

Objetivo general:

- Determinar el efecto antibacteriano de la combinación de droga 3Mix y MP y de sus combinaciones alternativas contra *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*.

Objetivo específico:

- Estipular la Concentración Inhibitoria Mínima de las combinaciones de drogas 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina), 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino y cefaclor), 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino y amoxicilina) sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
- Estipular la Concentración Bactericida Mínima de las combinaciones de drogas 3Mix, 3Mix-Cefaclor, 3Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
- Identificar el grado de sensibilidad antibacteriana de los vehículos macrogol, propilenglicol y su combinación (MP) contra *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

- Comparar los efectos de la combinación de droga 3Mix con sus combinaciones alternativas sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

2.5 Justificación

La caries dental según el Ministerio de Salud continua siendo la patología bucal más prevalente en la población peruana (90,4%)⁽²¹⁾ teniendo como grupo vulnerable a nuestros niños de edad escolar. Sumado a esto que el tratamiento de las lesiones producidas por la caries dental en los niños con piezas permanentes jóvenes (ápices abiertos) sigue siendo un desafío para el odontólogo ya que los tratamientos convencionales no son del todo efectivos debido a que se logra controlar la infección pero el diente sigue siendo frágil, con paredes dentinarias débiles y susceptible a posteriores fracturas y pérdida de la pieza dentaria, lo que conllevaría a un fracaso del tratamiento odontológico.

Debido al avance de la tecnología que aporta nuevas alternativas de tratamiento para dientes permanentes jóvenes (ápices abiertos) se propone el uso de la terapia de revascularización, la cual propone el uso de agentes antibacterianos para lograr la desinfección del sistema de conductos radiculares y generar el medio propicio para que se dé la revascularización, sin embargo existe muy poca información en nuestro país acerca de las características, propiedades, empleo de la Pasta 3Mix-MP y sus combinaciones alternativas, siendo la gran mayoría de información que se maneja de origen extranjero.

El presente estudio busca otorgar el sustento necesario para proponer el uso de dichas pastas como alternativas para la desinfección de conductos radiculares de dientes permanentes jóvenes, y lograr disminuir la tasa de fracaso en el tratamiento de estas patologías.

2.6 Limitaciones

- Dada la naturaleza del presente estudio, in vitro, los microorganismos se desarrollaron en condiciones ambientales simuladas en el laboratorio utilizando los parámetros necesarios para su desarrollo ideal; sin embargo existen más factores que pueden influir en condiciones in vivo.
- Las bacterias empleadas son muy exigentes en su crecimiento y tiempo de vida en medio aerobio, por tanto la supervivencia bacteriana se podría ver afectada durante el desarrollo del experimento.
- El factor económico influyó negativamente en este estudio ya que la mayoría de materiales que utilizamos fueron importados de otro país, ya que en nuestro país no los producen por tanto eso se vio reflejado en el costo elevado de los insumos.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

Banchs F. et al. (2004), realizaron un artículo de revisión sobre un nuevo procedimiento para el tratamiento de dientes permanentes inmaduros (ápices abiertos) con periodontitis apical llamado “revascularización”. La técnica de revascularización consistía en la desinfección del canal radicular con irrigación de hipoclorito de sodio a 5,25% sin instrumentación del canal radicular. Seguidamente de la colocación de la pasta 3Mix (Hoshino et al 1996) a 8 mm de profundidad en el canal radicular con un léntulo para eliminar a los agentes infecciosos presentes. Después de 26 días y lograr silencio clínico, se procede a irrigar con hipoclorito de sodio al 5.25% y con una lima endodóntica se procederá a inducir el sangrado en el interior del canal. Y se esperará unos 15 minutos a que se forme el coagulo, para luego ser sellado con MTA y una restauración definitiva.⁽¹²⁾

Dabbagh B. et al. (2008), realizaron una serie de reporte de casos sobre el uso de la técnica de revascularización en dientes permanentes inmaduros con pulpa necrótica, el cual tuvo como objetivo informar sobre el uso de la técnica de revascularización para los dientes permanentes inmaduros necróticos, los diversos problemas encontrados durante el tratamiento y las soluciones para estos problemas. Ellos reportaron tres problemas fundamentales durante el protocolo de tratamiento: coloración azulada de la corona, falta de presentación de la hemorragia y colapso del agregado trióxido mineral (MTA) dentro del canal. Para resolver estos problemas ellos sugieren cambiar uno de los antibióticos, usar anestesia local sin adrenalina y adición de una matriz de colágeno para que coagule la sangre como solución para cada problema encontrado respectivamente.⁽¹⁾

Reynolds K. et al. (2009), Realizaron un reporte de caso que tuvo como objetivo modificar la técnica convencional de revascularización mediante el sellado de los túbulos dentinarios de la cámara pulpar, para evitar el cambio de coloración en un segundo premolar inferior con necrosis pulpar. Utilizaron resina fluida para sellar los túbulos dentinarios de la cámara pulpar previamente gravados con ácido fosfórico al 35% y sellados con adhesivo, evitando así el contacto de la pasta 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina y agua destilada) y las paredes dentinales. Logrando evadir el posible cambio de coloración coronal por el componente de la minociclina.⁽¹⁷⁾

Trope M. (2010), realizó un artículo de revisión acerca de los protocolos de tratamientos para dientes inmaduros con pulpa no vital y periodontitis apical. Describe la técnica tradicional de apexificación con desinfección del canal radicular con hidróxido de calcio, la técnica de barrera con Trióxido mineral agregado (MTA) y por último la técnica de la revascularización de la pulpa.

Concluyendo que hay mejores beneficios en realizar la técnica regenerativas que las técnicas de apexificación convencional.⁽¹⁵⁾

Thomson A. et al. (2010), realizaron un reporte de un caso, que tuvo como objetivo describir el procedimiento regenerativo para dientes permanentes inmaduros, utilizando una combinación alternativa de pasta 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina y agua estéril) para tratamiento de una premolar inferior con necrosis pulpar y absceso periapical crónico. Ellos obtuvieron la resolución del cuadro y la maduración de la raíz logrando el cierre apical en un periodo de 18 meses, además se halló que no hubo ningún cambio de coloración en la corona. Concluyendo que los tratamientos de regeneración pulpar son efectivos para la resolución de cuadros de necrosis pulpar en dientes inmaduros, y sugieren que se podría utilizar una variación de la pasta 3Mix para evitar la decoloración coronal.⁽¹³⁾

Kim J. et al (2010), realizaron un estudio in vitro y un reporte de caso los cuales tuvieron como objetivo investigar la posible causa de la decoloración coronal y presentar la decoloración coronal después de la terapia antibiótica triple en un diente inmaduro respectivamente. Encontraron que luego de seis semanas de aplicar la pasta 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina y agua destilada) en la pieza 2.1 con léntulo se evidencio decoloración coronal en la pieza tratada, pero este problema fue revertido con el uso de blanqueamiento dental. Con respecto al estudio in vitro, se intentó determinar cuál de los 3 antibióticos causa la decoloración del diente, utilizaron dientes humanos extraídos. El grado de decoloración lo evaluaron mediante el uso de un colorímetro. Obtuvieron que solo la minociclina causó la decoloración del

diente. Por tanto concluyen que los problemas estéticos con el color se consideran cuando se utiliza la minociclina como medicación intraconducto.⁽²²⁾

Trairatvorakul C. et al (2012), realizaron un estudio el cual tuvo como objetivo evaluar clínica y radiográficamente la eficacia de la mezcla de 3 antibióticos en tratamientos de endodoncia no instrumentados de molares primarias mandibulares a los 24-27 meses post-tratamiento. La muestra estuvo conformada por 80 molares deciduas con signos clínicos y radiográficos para realizar una pulpectomía en 58 niños (3-8 años), se utilizó la pasta 3 Mix-MP (combinación de metronidazol, ciprofloxacino, minociclina, macrogol y propilenglicol) como medicación del tratamiento endodóntico no instrumentado, luego colocaron ionómero y resina antes de la restauración definitiva con coronas enteras metálicas. Realizaron seguimiento cada 6 meses por cerca de 2 años. Obtuvieron 36.7% de tasa de éxito con el uso de la pasta 3Mix-MP en tratamientos endodónticos no instrumentados y 15.8% de los casos mostraron respuesta pulpar.⁽²³⁾

Adl A. et al (2012), realizaron un estudio in vitro, en el cual tuvo como objetivo comprar la capacidad antibacteriana de la pasta 3Mix preparada con diferentes vehículos (agua destilada, clorhexidina 2%) y sus componentes en relación con mezclas de hidróxido de calcio a diferentes concentraciones contra *Enterococcus faecalis*. Utilizaron el método de difusión en agar (pocitos) y el de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Formando 9 grupos: pasta 3Mix con suero y otro con clorhexidina; metronidazol, minociclina, ciprofloxacino con suero; hidróxido de calcio con suero y otro con clorhexidina y fueron evaluados a diferentes concentraciones (25, 50, 100 y 200 µg/ml). Obtuvieron que las mayores zonas de inhibición fueron para la pasta 3Mix con suero y con

clorhexidina y que a medida que aumenta la concentración produce mayores efectos antibacterianos, se obtuvo resultados similares para el MIC. Concluyendo que la pasta 3Mix junto con suero o clorhexidina tiene mejor efecto contra *Enterococcus faecalis*.⁽¹⁴⁾

Lenherr P. et al (2012), realizaron un estudio sobre el cambio de coloración dental inducida por tratamientos endodónticos, teniendo como objetivo encontrar el potencial de cambio de color de materiales de endodoncia en un modelo bovino, para esto formaron 14 grupos de cubos cavitados de esmalte y dentina de origen bovino, los cuales se rellenaron con diferentes materiales y sellados con resina, y fueron almacenados en agua, para luego medir el color con el instrumento vita system 3d- Master, el primer día, a la semana, al mes a los 3 meses, a los 6 meses y al año de colocados. Obtuvieron más decoloración en el grupo de la pasta 3Mix-MP y el grupo de Ledermix, concluyendo que los materiales usados en endodoncia pueden causar manchas en los dientes por tanto se debe tener consideraciones estéticas al momento de elegir un material endodóntico.⁽²⁴⁾

Chuensombat S. et al (2013), realizaron un estudio que tuvo como finalidad determinar la citotoxicidad y eficacia antibacteriana de la pasta 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina y agua destilada) y de sus componentes. Utilizaron células de pulpa dental humana y células de la papila apical, las cuales fueron expuestas a la pasta 3mix y a sus componentes a diferentes concentraciones: 0.024, 0.097, 0.39, 1.56, 6.25 y 25.00 µg/ml a los 1, 3, 5 y 7 días. Se obtuvo que a la concentración de 0.024µg/ml todos los grupos tuvieron la máxima viabilidad celular en todos los periodos de tiempo, a 0.39µg/ml se obtuvo más del 90% de viabilidad celular, pero que no erradicaba

completamente las bacterias y a los 25µg/ml la pasta 3Mix eliminaba completamente las bacterias presentes. Concluyendo que todos los antibióticos excepto metronidazol producen citotoxicidad, además que la pasta 3Mix genera mayor citotoxicidad comparado con el uso aislado de cada componente y que la citotoxicidad aumenta a medida que aumenta la concentración, siendo la concentración de 0.39µg/ml de pasta 3Mix la que producía la menor citotoxicidad y lograba reducir significativamente las bacterias aisladas de dientes necróticos.⁽²⁵⁾

Namour M, et al. (2014), realizaron un artículo de revisión sobre revascularización en dientes permanentes inmaduros. Ellos exponen que la revascularización pulpar depende de la capacidad de la pulpa residual y células madres apicales y periodontales para diferenciarse. Ya que estas células tienen la capacidad de generar mucha vascularización y un rico tejido conjuntivo que puede colonizar el espacio pulpar disponible. Por eso este nuevo tratamiento de dientes permanentes inmaduros es superior a los tratamientos de apexificación con hidróxido de calcio o MTA, los cuales solo producen una barrera apical artificial. Sin embargo la revascularización permite la estimulación y maduración apical de la raíz de los dientes inmaduros. La literatura reporta 2 técnicas para lograr la revascularización, uno usando hidróxido de calcio y la segunda usando la pasta 3Mix(metronidazol, ciprofloxacino, minociclina y propilenglicol)⁽¹¹⁾

Nagata J, et al (2014), realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar la composición microbiana y su reducción durante procedimientos de revascularización de dientes inmaduros traumatizados. La muestra estuvo conformada por 15 pacientes de edades de 7 -17 años con dientes

permanentes inmaduros con diagnóstico de necrosis pulpar por trauma dental. Se dividieron en 2 grupos según la medicación intracanal: Grupo de 3Mix-MP y grupo de combinación de hidróxido de calcio con clorhexidina 2%. Las bacterias recuperadas fueron identificadas por medio de PCR. Se encontró que las bacterias más prevalentes fueron *Actynomices Naeslundii* (66,67%), seguido por *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micras* y *Fusobacterium nucleatum* (33.34%), siendo 2.13 el promedio de especies bacterianas por canal y no se encontró correlación estadística entre especie bacteriana y características clínica/radiográfica. Concluyen que el perfil microbiano de dientes inmaduros infectados es similar a la de los dientes permanentes infectados y que la mayor reducción bacteriana se da por medio de las soluciones irrigadoras además de que el uso de medicación intracanal es efectivo para la reducción de bacterias en dientes inmaduros necróticos.⁽¹⁹⁾

Prather B, et al (2014), investigaron los efectos de la pasta 3Mix y la pasta 3Mix Modificada sobre la microdureza y la estructura química de la dentina radicular. Utilizaron raíces de dientes humanos (premolaes) cortados en forma de cilindros. Se dividió en 2 grupos de tratamiento: 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina y vehículo agua estéril) y pasta 3Mix modificada (metronidazol, ciprofloxacino, clindamicina vehículo agua estéril). Los cilindros fueron almacenados a una humedad relativa del 100% por 4 semanas. Para luego ser sometidos a pruebas de microdureza. Se encontró que todos los grupos mostraron reducciones en la microdureza de las raíces en comparación con el grupo control. Concluyendo que el uso de 1 mg/ml de 3Mix a base de metilcelulosa y 3Mix modificada pueden minimizar la reducción de la microdureza de las raíces en comparación de las concentraciones utilizadas actualmente.⁽²⁶⁾

3.2 Bases teóricas

3.2.1 Embriología Dental

3.2.1.1 Generalidades

El desarrollo de los dientes abarca un período prolongado, comenzando con la inducción de la dentición primaria durante el segundo mes de la embriogénesis hasta el término de la adolescencia que culmina con la dentición permanente.⁽²⁷⁾

Los primeros cambios en la formación de dientes ocurren tempranamente en la sexta semana de vida prenatal. Los procesos de formación individual del diente proceden a partir de dos tipos de células: células epiteliales bucales que forman el órgano del esmalte y las células mesenquimatosas que forman la papila dental. La interacción de estas células es vital para la iniciación y formación de los dientes. Ya que el esmalte se forma a partir del órgano del esmalte y la dentina a partir de la papila dental.⁽²⁸⁾

3.2.1.2 Etapas del desarrollo dental

El desarrollo dentario comprende una serie de cambios químicos, morfológicos y funcionales que inician en la sexta semana de vida intrauterina y continua a lo largo de toda la vida del diente. Sin embargo es un proceso continuo al que se ha dividido en etapas o estadios: Estadio de Brote o yema dentaria, Estadio de casquete y Estadio de campana.⁽²⁸⁾

Estadio de brote o yema

Durante la sexta semana de vida intrauterina, se inicia la formación de los dientes con una proliferación localizada de ectodermo asociada con los procesos maxilares superior e inferior. La actividad proliferativa trae como resultado la formación de dos estructuras en forma de herradura (U), sobre cada proceso, las cuales son denominadas láminas dentales.⁽²⁸⁾

Las células epiteliales de la lámina dental inician su proliferación originando las yemas dentales, que no son otra cosa que una proyección redondeada u

ovalada en forma de brote o yema en el ectomesénquima adyacente, y que serán las precursoras de los dientes primarios. Aparecen, casi simultáneamente, diez yemas que serán los futuros órganos del esmalte de los dientes primarios en cada maxilar.^{(28), (29)}

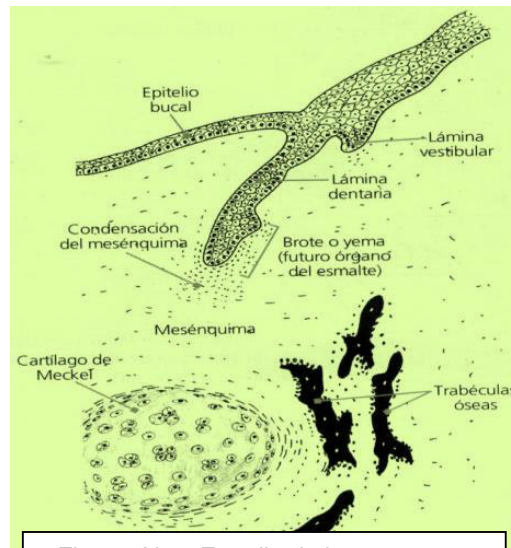


Figura N°1.-Estadio de brote o yema

- **Estadio de casquete**

Alrededor de la novena semana de vida intrauterina, la superficie profunda de los brotes se invagina y se hacen evidentes el epitelio interno, el epitelio externo y el retículo estrellado.⁽²⁸⁾

El epitelio externo está constituido por una sola capa de células cuboideas bajas, unidas a la lámina dental por una porción de epitelio (pedículo epitelial), el epitelio interno es una capa de células cilíndricas bajas a nivel de la concavidad, las cuales irán aumentando en altura hasta diferenciarse en ameloblastos. Entre ambos epitelios, por aumento de líquido intercelular mucoide rico en glucógeno, se forma una tercera capa: El retículo estrellado u órgano dental, constituido por células de aspecto estrellado cuyas prolongaciones se anastomosan formando un retículo.⁽²⁸⁾

La proliferación epitelial se fija a la lámina dental por un tramo de epitelio que sigue creciendo y proliferando hacia el tejido conjuntivo.

El mesénquima condensado se invagina y forma la papila dental. Las células mesenquimatosas de la papila adyacente a la capa interna se diferencian en odontoblastos que producirán luego la dentina. Las células restantes de la papila dental forman la pulpa del diente. Esto corresponde a la condensación de tejido conjuntivo bajo el epitelio dental interno, y que más tarde se convierte en la pulpa dental. En un principio las células de la papila dental son grandes y redondeadas con citoplasma pálido y núcleo grande. Al mismo tiempo, se condensa el mesénquima que rodea el exterior del diente en desarrollo y se torna más fibroso. Este tejido se llama saco dental o folículo dental. Las células del saco dental formarán los tejidos del periodonto, que son: el ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar.⁽²⁸⁾

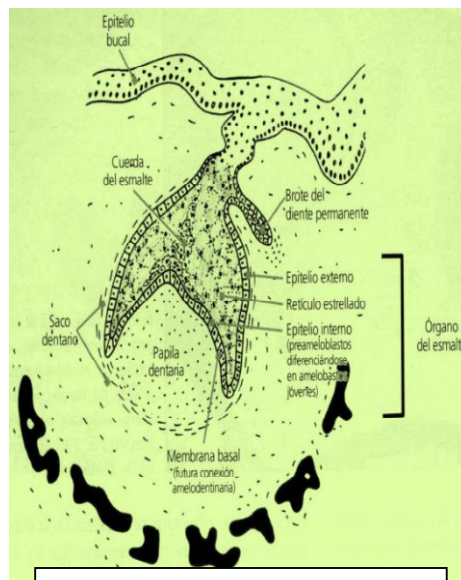


Figura N°2.-Estadio de casquete

- **Estadio de campana**

Ocurre sobre las catorce a dieciocho semanas de vida intrauterina. Se acentúa la invaginación del epitelio interno y ocurren una serie de interacciones entre las células epiteliales y mesenquimatosas que originan diferenciación de las células del epitelio dental interno en células columnares altas, llamadas ameloblastos. El intercambio de información inductiva entre epitelio y mesénquima ocurre a través de la membrana basal. Los ameloblastos contribuyen a formar esmalte. Las células de la papila dental, que están debajo de los ameloblastos, se diferencian en odontoblastos las cuales van a elaborar predentina. Esta predentina se calcifica y se convierte en dentina, entonces es ahí cuando la porción de la papila se transforma en pulpa dentaria. Varias capas de células escamosas de poca altura empiezan a surgir junto al epitelio dental interno. Esta capa se llama estrato intermedio.⁽²⁸⁾

Durante esta última etapa, se determina la morfología de la corona. La capa celular del epitelio interno del órgano dental se pliega dando lugar a la forma, número y distribución de las cúspides, según el tipo de elemento dentario al que dará origen. También durante esta etapa, los vasos sanguíneos llegan a establecerse en la papila dental. En la etapa de campana, la lámina lateral degenera y se ve invadida y reemplazada por el tejido mesenquimal. Rompiéndose así la conexión epitelial entre el órgano del esmalte y el epitelio oral. El extremo libre de la lámina dental asociado a cada uno de los dientes primarios continúa creciendo y forma la lámina sucesional. Siendo a partir de esta estructura donde aparece la yema dental del diente sucedáneo.⁽³⁰⁾

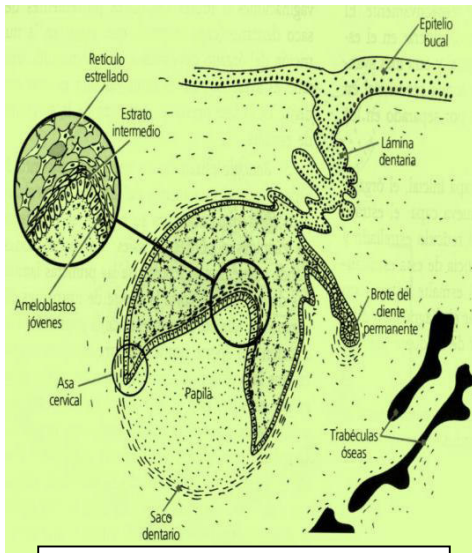


Figura N°3.-Estadio de campana

Las figuras fueron tomadas de Gómez M y Campos A.⁽²⁸⁾

3.2.1.3 Desarrollo radicular y apical

El desarrollo de la raíz comienza una vez completada la formación del esmalte y la dentina. La unión de las células de los extremos apicales del epitelio dental externo e interno dan origen al asa o curva cervical, la cual al desarrollarse forma una estructura conocida como la vaina epitelial de Hertwig. Esta estructura desempeña un papel fundamental como inductora y modeladora de la raíz del diente.⁽²⁸⁾

La vaina epitelial de Hertwig prolifera en profundidad en relación con el saco dentinario por su parte externa y con la papila dentaria internamente. Cuando esto sucede la vaina induce a la papila para que se diferencien los odontoblastos radiculares, los cuales van a sintetizar dentina radicular⁽²⁸⁾

La vaina radicular de Hertwig una vez que alcanza su máximo desarrollo conforma el diafragma epitelial, por el cual ejerce su función modeladora, la cual determina el tamaño, forma y número de raíces. Esta estructura marca el límite distal de la raíz y envuelve al agujero apical primario, por el cual entran y salen nervios y vasos sanguíneos del periapice a la cavidad pulpar. Algunos

autores consideran que en ese momento la papila se ha transformado en pulpa dental.⁽²⁸⁾

En síntesis, la elaboración de dentina radicular por los odontoblastos es seguida por la regresión de la vaina y la diferenciación de los cementoblastos, a partir de las células mesenquimáticas indiferenciadas del ectomesénquima del saco dentario que rodea la vaina.

La formación del patrón radicular involucra, también fenómenos inductivos; el epitelio de la vaina modela además el futuro límite dentinocementario e induce la formación de dentina por dentro y cemento por fuera, además que cuando la vaina se fragmenta, es decir pierde su continuidad forma los restos epiteliales de Malassez, que en el adulto persisten cercanos a la superficie radicular dentro del ligamento periodontal.^{(28),(30)}

Cabe resaltar que la vaina radicular de Hertwig es muy sensible a los traumatismos, necrosis del tejido pulpar y procesos apicales, y una vez destruida, se detiene el desarrollo normal de la raíz, ya que no hay más diferenciación de odontoblastos. En un diente permanente inmaduro, esto deja una raíz con ápice abierto, de paredes delgadas, débiles y un ligamento periodontal discontinuo. El ligamento periodontal tiene una función de apoyo a los dientes en los maxilares, así como también contribuye a la nutrición del diente, a la homeostasis y reparación de los tejidos dañados.⁽³¹⁾

3.2.2 Diente Permanente Inmaduro

3.2.2.1 Definición

Los dientes permanentes inmaduros, también llamados dientes con rizogénesis incompleta, con ápice inmaduro, con ápice incompleto, con ápices abierto o incluso dientes permanentes jóvenes se caracterizan por no presentar la raíz formada por completo, la cual ha sido definida como ausencia

de la constricción apical del conducto (que en promedio corresponde a 0.3 o 0.5 milímetros desde el ápice anatómico en un diente inmaduro) y en donde la apertura en comparación con el diente maduro es muy grande. ⁽³²⁾

El ápice abierto, según Walton, ⁽³²⁾ puede clasificarse en:

- **Ápice de tipo arcabuz:** paredes del conducto divergentes con aspecto más amplio en el ápice.
- **Ápice de tipo no arcabuz:** paredes del conducto paralelas o un poco convergentes.

Las complicaciones que genera un ápice abierto son principalmente el compromiso de la proporción normal entre la corona y la raíz, y la dificultad de lograr un sellado apical con una obturación endodóntica convencional. ⁽³²⁾

3.2.2.2 Características anatómicas de los dientes permanentes inmaduros

Los dientes permanentes inmaduros poseen las siguientes características anatómicas:

- Raíz de formación incompleta.
- Conductos amplios de forma troncocónica con base hacia apical.
- Cámara pulpar amplia y bulbosa.
- Foramen apical sin formar y de gran diámetro. ⁽³³⁾

3.2.2.3 Clasificación del desarrollo radicular y apical

Patterson en 1958 publicó una clasificación muy didáctica de los dientes permanentes inmaduros según su desarrollo radicular y apical, dividiéndolos en las siguientes cinco grados ⁽³⁴⁾:

Grado 1: Desarrollo parcial de la raíz con lúmen apical mayor que el diámetro del conducto. Desarrollo radicular hasta la mitad de su longitud total. Ápice abierto en embudo. Transición hacia el estadio 8.

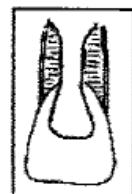


Figura N°4.-Raíz 2/3

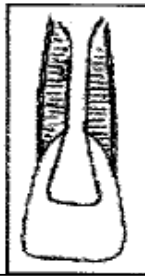


Figura N°5.-Raíz 2/3

Grado 2: Desarrollo casi completo de la raíz. Con lumen apical mayor que el conducto. Desarrollo radicular de $\frac{2}{3}$ de su longitud y ápice de paredes divergentes. El conducto radicular tiene la forma de trombón o trabuco (Estadio 8 de Nolla).

Grado 3: Desarrollo completo de la raíz con lumen apical de igual diámetro que del conducto. Desarrollo radicular de $\frac{3}{4}$ de su longitud. Ápices de paredes paralelas. Transición hacia el estadio 9.

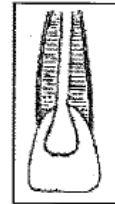


Figura N°6.-Raíz 3/4

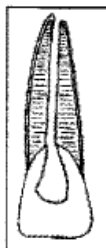


Figura N°7.- Raíz completa

Grado 4: Desarrollo completo de la raíz con diámetro apical más pequeño que el del conducto. Desarrollo radicular completo. Ápice abierto. El conducto tiene la forma cilíndrica (Estadio 9).

Grado 5: Desarrollo completo de la raíz con tamaño microscópico apical. El conducto presenta la forma cónica de la pieza adulta. Después de 3 años, se forma la unión cemento dentinaria y se da el cierre apical (Estadio 10).

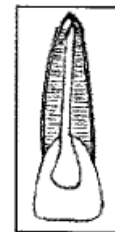


Figura N°8.- Raíz con cierre especial

Las figuras fueron tomadas de Velásquez V y Álvarez M.⁽³⁴⁾

3.2.2.4 Características histológicas de los dientes permanentes inmaduros

Las pulpas de los dientes permanentes inmaduros se caracterizan por presentar pocas fibras y muchas células, eso le confiere una gran capacidad de defensa y respuesta a los tratamientos biológicos y de estímulo pulpar.⁽³⁵⁾

Se caracterizan por:

- Presentar gran potencial de diferenciación celular, permitiendo mayor capacidad de reaccionar frente a agentes externos.
- Gran vascularización, lo que le da abundante aporte nutricional.
- Intensa actividad calcificadora, para seguir produciendo dentina secundaria junto a la existente, la que formará con el cemento el tercio apical radicular.⁽³⁵⁾

3.2.2.5 Patología pulpar y periapical en dientes permanentes inmaduros

Entre las causas más frecuentes de las lesiones pulpares en dientes permanentes inmaduros tenemos los traumatismos dentarios y la caries dental.⁽³⁶⁾

Con respecto a los traumatismos dentarios, Andreasen y cols⁽³⁷⁾, refieren que las lesiones traumáticas afectan en un 30% a los niños, siendo los incisivos centrales superiores los más afectados y susceptibles a las lesiones periapicales.⁽³⁷⁾

Las lesiones por traumatismo varían de avulsión, intrusión, extrusión, luxación lateral, fractura coronal, fractura radicular o simplemente una concusión. El tejido pulpar de un diente que experimenta una lesión traumática puede reaccionar de tres maneras diferentes: con necrosis pulpar, reparación pulpar o con obliteración del espacio pulpar.⁴⁰

El desarrollo de necrosis pulpar depende de dos factores significativos:

1. Tipo y severidad del daño, en este sentido la mayor frecuencia de necrosis se encuentra entre las intrusiones (85%) seguida por la luxación lateral (58%) y la extrusión (26%), mientras la menor ocurrencia es después de una subluxación (14%) y concusión (3%).
2. Estado de desarrollo del diente al momento de la injuria, la necrosis pulpar ocurre más frecuentemente en dientes con raíces totalmente

desarrolladas (38%), en comparación con dientes permanentes inmaduros (8%), en los cuales la posibilidad de supervivencia de la pulpa es favorecida por un mayor diámetro del foramen apical. Sin embargo cuando ocurre necrosis pulpar en un diente incompletamente formado, esta origina cese del desarrollo dental, por lo que un ápice abierto es una de las características comunes que se observan en pacientes pediátricos con lesiones traumáticas dentales.⁽³⁷⁾

El área apical del diente se involucra cuando la infección bacteriana invade la pulpa, produciendo necrosis parcial o total. La patología periapical es el resultado de las bacterias, sus productos y la respuesta del huésped a los mismos.⁽³⁶⁾

Por otra parte, el avance de la lesión cariosa dado por la suma de agentes irritantes, que incluyen factores físicos y químicos, que provocan una mayor exposición de dentina al medio bucal, generarán las primeras alteraciones vasculares a la pulpa dental, caracterizadas por un proceso inflamatorio incipiente en el cual se produce una congestión sanguínea, un estado inflamatorio reactivo, considerado como un período inicial inflamatorio, indicando que la resistencia normal de la pulpa está llegando al límite de tolerancia fisiológica. Cuando este cuadro avanza genera diferentes grados en la enfermedad pulpar y periapical las cuales se clasifican de la siguiente manera según Berman⁽³⁶⁾

- **Enfermedades pulpares**

- **Pulpitis reversible:** Se dice que existe una pulpitis reversible Cuando la pulpa está irritada de modo que su estimulación resulta incomoda para el paciente pero revierte rápidamente después de la irritación. Entre los factores etiológicos están las caries, la dentina expuesta, los tratamientos dentales recientes y las restauraciones defectuosas. La eliminación conservadora del factor irritante resolverá los síntomas.⁽³⁶⁾

- **Pulpitis irreversible:** Es la inflamación de la pulpa sin capacidad de recuperación, a pesar de que cesen los estímulos externos que han provocado el estado inflamatorio. La pulpa no se recuperará y poco a poco degenerará y se ocasionará necrosis o destrucción reactiva.

Quando la afección pulpar evoluciona hacia una pulpitis irreversible es necesario instaurar un tratamiento para eliminar el tejido enfermo. La pulpitis irreversible puede ser sintomática y asintomática.⁽³⁶⁾

- ✓ **Pulpitis irreversible sintomática:** Los dientes que se caracterizan por una pulpitis irreversible sintomática muestran un dolor intermitente o espontáneo. La rápida exposición de los dientes de este grupo a drásticos cambios de temperatura (Especialmente a estímulos fríos) aumentará y prolongará los episodios de dolor incluso después de eliminar el estímulo térmico. El dolor puede ser agudo o sordo, localizado o referido. Típicamente, el aspecto radiográfico del hueso perirradicular muestra cambios mínimos. Al progresar, la pulpitis irreversible puede manifestarse por un ensanchamiento del ligamento periodontal en la radiografía y puede haber indicios de irritación pulpar por una calcificación extensa de la cámara pulpar y del espacio del conducto radicular. Entre los antecedentes puede haber obturaciones profundas, caries, exposición de la pulpa, o cualquier otra agresión directa o indirecta pulpar, reciente o antigua, y se puede apreciar radiográficamente o clínicamente o venir sugerida por los antecedentes dentales. Normalmente, si no se trata una pulpitis irreversible sintomática, el diente acaba sucumbiendo hacia la necrosis.⁽³⁶⁾
- ✓ **Pulpitis irreversible asintomática:** En ocasiones, una caries profunda no dará lugar a ningún síntoma, incluso aunque clínica y radiográficamente la caries haya avanzado hasta la pulpa. Si no se trata, el diente puede empezar a desarrollar síntomas o la pulpa

acabará necrosándose. En los casos de pulpitis irreversible asintomática debe instaurarse un tratamiento endodóntico lo antes posible para que no se produzca una pulpitis irreversible sintomática y ocasione dolor intenso y molestias al paciente.⁽³⁶⁾

- **Necrosis pulpar:** Cuando se produce una necrosis pulpar (o pulpa desvitalizada), la vascularización pulpar es inexistente y los nervios pulpares no son funcionales. Esta afección es posterior a la pulpitis irreversible sintomática o asintomática. Cuando la pulpa está totalmente necrosada, el diente suele estar asintomático hasta que aparecen síntomas por extensión de la enfermedad a los tejidos perirradiculares. Con necrosis pulpar, el diente no responderá a las pruebas pulpares eléctricas ni a la estimulación con frío. Sin embargo, si el calor se prolonga más tiempo, el diente puede responder a este estímulo. Esta respuesta podría estar relacionada con restos de líquidos o gases en el espacio del conducto pulpar que se expanden y extienden a los tejidos periapicales. La necrosis pulpar puede ser parcial o completa y afectar a todos los conductos en un diente multirradicular. Por dicha razón, el diente puede dar lugar a síntomas confusos, en los que las pruebas pulpares sobre una raíz pueden no evocar ninguna respuesta mientras que en otra pueden dar una respuesta de vitalidad.⁽³⁶⁾

- **Enfermedades periapicales** (Según Berman⁽³⁶⁾)

- **Periodontitis apical sintomática:** es un proceso inflamatorio agudo alrededor del ápice. Cuando la pulpa ha experimentado necrosis y no se trata la enfermedad avanza hacia la siguiente fase que es la periodontitis apical. Esta patología se caracteriza por exhibir una respuesta dolorosa al morder o a la percusión además de observar en la radiografía el espacio del ligamento

periodontal ensanchado y puede existir o no una radiolucidez apical asociada a una o todas las raíces.⁽³⁶⁾

- **Periodontitis apical asintomática:** es una respuesta mantenida en el tiempo y de relativo o de bajo grado debido a las bacterias del conducto y a los irritantes. Clínicamente, esta lesión suele ser asintomática y se detecta con radiolucidez apical. Esta lesión se caracteriza por el predominio de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos rodeados por una cápsula fibrosa apenas inflamada compuesta por colágeno, fibroblastos y brotes capilares.⁽³⁶⁾
- **Absceso apical agudo:** Un absceso apical agudo se produce cuando un gran número de bacterias pasan al ápice y provocan una respuesta inflamatoria grave. El absceso se define como un acumulo de pus localizado, microscópicamente compuesto por células muertas, detritos, polimorfonucleares y macrófagos. Clínicamente los grados de inflamación, con o sin dolor, son variables.⁽³⁶⁾
- **Absceso apical crónico:** Un diente con un absceso apical crónico no presentará normalmente síntomas clínicos. Este diente no responderá a las pruebas de vitalidad pulpar y la imagen radiográfica evidenciará una radiolucidez perirradicular. El diente normalmente no está sensible al morder pero el paciente puede notarlo diferente a la percusión. Esta entidad se diferenciará de la periodontitis perirradicular crónica porque mostrará una supuración intermitente a través del tracto sinusal asociado.⁽³⁶⁾

3.2.2.6 Microbiología de los Conductos Radiculares en Necrosis Pulpar de dientes permanentes inmaduros

Cuando la pulpa dental es expuesta debido a diversos factores, las bacterias orales pueden invadir y causar inflamación pulpar.⁽³⁸⁾

Las reacciones inflamatorias de la pulpa dental son generadas debido a los productos tóxicos y metabólicos de las bacterias presentes en la cavidad oral.

Todas las bacterias dentro de la cavidad oral pueden invadir el espacio del conducto radicular; sin embargo sólo un grupo restringido de especies ha sido identificado en los conductos radiculares infectados.⁽³⁸⁾ La razón de la desproporcionada relación entre el número real y potencial de las especies es que el conducto radicular es el único ambiente donde la selección biológica impulsa el tipo y curso de la infección. El medio anaeróbico del conducto radicular, las interacciones entre los factores microbianos y la disponibilidad de nutrición son los principales elementos que delimitan la composición de la flora microbiana, siendo estas bacterias anaerobias.⁽³⁸⁾

El número de especies bacterianas en el canal radicular varía de 1 a más de 12 y el número de células bacterianas varía de $< 10^2$ a $>10^8$ por especie. Parece que existe una correlación entre el tamaño de la lesión periapical y el número de especies bacterianas y células en el canal radicular. Los dientes con infecciones de larga data generalmente tienen lesiones más grandes por tanto albergan más bacterias en el interior del canal radicular que dientes con lesiones pequeñas.⁽³⁸⁾

Está bien establecido que si las bacterias y sus subproductos promueven alteraciones patológicas en el tejido pulpar inmaduro, el desarrollo de la raíz puede detenerse.

Nagata et al⁽¹⁹⁾, evaluaron la composición microbiana y su reducción durante procedimientos de revascularización de dientes inmaduros traumatizados, encontrando bacterias anaerobias estrictas tales como *Actinomices naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micras*, *Tanarella forsythia*, *Filifactor alocis* y *Treponema denticola*, siendo las cuatro primeras las más prevalentes en los dientes permanentes inmaduros y las últimas se encontraron en mayor porcentaje en dientes necróticos con ápices completamente formados. Se sabe que *Enterococcus faecalis* es una bacteria de importancia ya que está presente en

tratamientos de infecciones apicales resistentes , sin embargo no es una bacteria frecuente en la infección primaria de dientes permanentes inmaduros⁽¹⁴⁾ pero se sabe que está presente en la endocarditis y basado en el tratamiento de esta enfermedad con antibióticos, podemos extrapolar el uso de componentes similares para la regeneración pulpar, además su espectro bactericida es similar al que se utiliza para la desinfección de la raíz.⁽⁵⁾

Muchos estudio han demostrado que el perfil microbiano de dientes inmaduros infectados es similar al encontrado en dientes permanentes infectados. ^{(19),(38)}

3.2.2.7 Diagnóstico de alteraciones pulpares y periapicales en diente permanentes inmaduros

La presencia de un ápice abierto complica considerablemente el tratamiento de las lesiones pulpares, por tal razón se sugiere realizar una evaluación minuciosa de cada caso y un diagnóstico pulpar exacto como parte del tratamiento de los dientes inmaduros con lesiones pulpares. ⁽³²⁾

La evaluación del estado de la pulpa se basa en una anamnesis completa de los síntomas subjetivos, exploración clínica y radiológica exhaustiva. ⁽³²⁾

Con respecto al estado de la pulpa, se requiere tener en cuenta algunos síntomas como las características del dolor (sordo o agudo: localizado o difuso; fugaz o persistente; continuo o intermitente), unidos a un examen clínico cuidadoso (inspección, palpación y percusión). Pueden unirse las pruebas térmicas y la prueba eléctrica, pero sus resultados tienen que interpretarse con cautela, ya que el ápice es inmaduro, por eso la capa parietal de nervios (plexo de Raschkow) no está desarrollada por completo y la pulpa no responderá a estímulos en la forma habitual, debido a que se encuentra poco inervada. ⁽³³⁾

Si hay dificultades para identificar el estado de la pulpa, el examen radiográfico podría ser esclarecedor ya que nos proporcionará información sobre la condición de los tejidos periapicales y el grado de desarrollo radicular.⁽³³⁾ La interpretación de las radiografías pueden plantear dificultades en el caso de las raíces inmaduras en proceso de desarrollo.⁽³²⁾

Normalmente, el ápice de un diente inmaduro con una pulpa sana esta rodeado por una zona de radiotransparencia, puede haber problemas para diferenciar entre este hallazgo y una radiotransparencia patológica causada por una pulpa necrótica. Para poder hacer un buen diagnóstico diferencial debemos tener en cuenta que una lesión radiotransparente suele presentar un borde difuso y descortinado, también puede servir de ayuda la comparación con el periápice del diente contralateral.⁽³²⁾

Desgraciadamente, no existe una correlación estrecha entre los resultados de estas pruebas y el diagnóstico histológico real del estado pulpar, no obstante, combinando los resultados de la anamnesis, la exploración clínica y las pruebas diagnósticas es posible conocer con exactitud el estado pulpar y periapical en la mayoría de los casos.⁽³²⁾

3.2.2.8 Tratamiento de dientes permanentes inmaduros no vitales

Un diente inmaduro con necrosis pulpar y periodontitis apical representa un desafío para el odontólogo, especialmente para los endodoncistas y odontopediatras a quienes por lo general le son referidos estos casos.^{(39),(40)}

Las técnicas tradicionales, en las cuales se efectúa una instrumentación químico-mecánica y se desinfectan los conductos radiculares cuando se tratan de dientes maduros, está limitada por la anatomía que pueda tener el diente inmaduro, debido a que no se cuenta con un tope apical.⁽²⁰⁾

Para lograr un tratamiento exitoso en los dientes permanentes con ápice abierto, pulpa necrótica, y periodontitis apical se debe tener ciertas consideraciones.^{(33),(40)}

1. No se puede utilizar el protocolo convencional de desinfección de conductos radiculares infectados, ya que por su condición presentan paredes radiculares delgadas y se verían afectadas aún más.
2. El ápice abierto no ofrece la barrera apical, para que contenga el material de obturación radicular, debido a eso dificulta la obturación del conducto radicular.
3. Después de completar el tratamiento endodóntico, las raíces de esos dientes, son todavía delgadas y tienen un gran riesgo a la fractura.^{(33),(40)}

Estas consideraciones pueden ser manejadas utilizando un protocolo de desinfección, que minimice la instrumentación del conducto radicular y se debe estimular la formación de una barrera de tejido duro con la promoción de una barrera apical que permita la obturación del conducto, reforzando las paredes radiculares para evitar fracturas durante y después de que la barrera apical se haya realizado.^{(33),(40)}

Los factores más importantes que hay que considerar a la hora de planificar el tratamiento son el estado de la pulpa y el grado de desarrollo radicular.⁽³²⁾ Se puede buscar la estimulación del crecimiento apical continuo cuando la pulpa tenga vitalidad (apicogénesis) o intentar la inducción de una barrera apical en caso de necrosis (apicoformación/apexificación). Otra alternativa viable sería realizar una obturación retrograda.⁽³²⁾

Las opciones de tratamiento en dientes permanentes inmaduros con necrosis pulpar consisten principalmente en Apicoformación, mediante el uso de hidróxido de calcio -Ca (OH)₂- y mineral de trióxido agregado (MTA) y más recientemente la Revascularización Pulpar.^{(20),(41),(42)}

3.2.3 Apicoformación o apexificación

3.2.3.1 Definición

La apicoformación o apexificación de acuerdo a la Asociación Americana de Endodoncia, es un método que induce la formación de una barrera calcificada en un diente con ápice abierto o la continuación del desarrollo apical de una raíz incompletamente formada en dientes con pulpa necrótica.⁽⁴³⁾

Es definido también como un procedimiento mediante el cual se induce a la formación de una barrera calcificada y poder cerrar el ápice abierto de un diente permanente joven con una pulpa no vital, de forma tal que los materiales obturadores puedan colocarse dentro del conducto radicular.⁽³²⁾

3.2.3.2 Apexificación con Hidróxido de Calcio

El hidróxido de calcio $\text{-Ca(OH)}_2\text{-}$ ha sido el material más utilizado para inducir la formación de una barrera apical,⁽³²⁾ dicha barrera puede ser dura, irregular o porosa. El hidróxido de calcio se comporta como un medicamento antimicrobiano, liberando iones hidroxilos que pueden causar daño a los componentes celulares bacterianos ya que va destruir la membrana citoplasmática, produciendo la desnaturalización de proteínas y daño al ADN bacteriano^{(32),(44)}

Se ha demostrado que la reacción de los tejidos periapicales a esta sustancia es parecida a la que experimenta el tejido pulpar. El hidróxido de calcio por tener un pH elevado produce una necrosis estéril en varias capas generando una irritación leve del tejido subyacente para producir una respuesta inflamatoria y que en ausencia de bacterias, ocurrirá cicatrización y permitirá la aparición de una barrera de tejido duro.^{(32),(44)}

En la literatura no hay consenso sobre la naturaleza histológica del tejido responsable de este cierre. Algunos consideran que es cemento dental, otros admiten la posibilidad de que sea dentina, hueso.⁽³³⁾

La apexificación con Ca(OH)_2 tiene una serie de desventajas:^{(15),(12),(39),(45)}

1. Induce la formación de tejido calcificado que sella el espacio de la pulpa impidiendo su regeneración.
2. Destruye la vaina epitelial de Hertwig, afectando la capacidad de inducir la formación de odontoblastos a partir de las células indiferenciadas.
3. El tiempo total de tratamiento es más largo, hasta 20 meses.
4. Se requieren múltiples citas para el recambio del material, hasta completarse la formación de la barrera apical.
5. Costo clínico más elevado.
6. Requiere mayor colaboración del paciente.
7. Aumento del riesgo de fractura radicular.

3.2.3.3 Apexificación con trióxido mineral agregado

El tratamiento de apexificación con MTA consiste en colocar una barrera artificial en el ápice contra la que será posible condensar un material de obturación. El trióxido mineral agregado, es colocado en el conducto radicular sellando 3 a 4 mm del ápice, creando una barrera apical en un diente inmaduro en una sesión de tratamiento.^{(15),(32),(32, 40)}

La apexificación con MTA tiene una serie de ventajas:^{(39),(46),(47),(48),(49)}

1. Es biocompatible.
2. Posee propiedades osteoinductivas al promover la inducción de tejido duro en el tejido periodontal.
3. Estimula la formación de un puente de dentina adyacente a la pulpa dental.
4. Alto nivel de adaptación marginal y reduce el grado de microfiltración de bacterias desde el periodonto.

Estas ventajas, han ampliado el uso del MTA para:^{(46),(50)}

1. Reparación de perforaciones del conducto radicular.
2. Recubrimiento pulpar directo.

3. Barrera durante el blanqueamiento interno de conductos radiculares.
4. Apexificación.

El proceso de apexificación se ha convertido es un procedimiento con éxito predecible. Sin embargo, las paredes dentinarias todavía representan un problema clínico ya que el MTA no promueve la formación completa de las paredes dentinarias del conducto radicular.^{(2),(16),(39)} Se ha reportado que aproximadamente 30% de estos dientes podrían fracturarse durante o después del tratamiento endodóntico.⁽⁵¹⁾

3.2.4 Procedimientos Endodónticos Regenerativos

3.2.4.1 Definición

Se pueden definir como procedimientos con bases biológicas diseñados para restablecer las estructuras dañadas, incluyendo dentina y células del complejo pulpo-dentinario.⁽⁵²⁾

3.2.4.2 Regeneración pulpar en dientes necróticos

Hace un tiempo atrás se consideraba imposible la regeneración del espacio pulpar en un diente con necrosis pulpar y periodontitis apical se consideraba^{(15),(17),(12)}, sin embargo a partir del año 1961 iniciaron a documentar el desarrollo radicular y la formación de una barrera apical en casos de necrosis pulpar en dientes permanentes jóvenes.⁽⁵³⁾

La regeneración de una pulpa parcialmente necrótica en una raíz inmadura está basada en 3 principios básicos de la ingeniería tisular:⁽⁵⁴⁾

1. Apropriada fuente de células madres o progenitoras.
2. Factores de crecimiento capaces de promover la diferenciación de las células madre.
3. Andamios apropiados para la regulación de la diferenciación celular.

Por esta razón la revascularización pulpar dependerá de 3 elementos: desinfección del canal radicular, presencia de un andamio (coágulo) y restauración coronaria hermética, mientras que para la generación de tejido funcional es necesario tener 3 elementos claves: células madres, factores de crecimiento, y un andamio (coágulo).⁽⁵⁾

3.2.4.3 Protocolo de la terapia de regeneración pulpar en dientes permanentes

inmaduros no vitales

Los protocolos para la regeneración pulpar derivan de las observaciones de dientes reimplantados y autotransplantados en animales de experimentación en el que una pulpa necrótica, libre de infección, provee de una matriz en la cual las células del tejido periapical podrían crecer y restablecer la vascularidad pulpar, reemplazando lentamente el tejido necrótico.⁽⁵⁵⁾

Los pasos a seguir en el protocolo de regeneración son:

- Desinfección del conducto

La desinfección de un diente inmaduro necrótico mediante instrumentación mecánica del conducto radicular no está indicada para estos casos, debido a que aumentará la fragilidad de las paredes dentinarias y se podría dañar a las células madre presentes en el área apical. Es importante no realizar la instrumentación mecánica debido a que dichas paredes dentinarias contienen factores de crecimiento entre otras células esenciales en el proceso de regeneración (odontoblastos y células epiteliales de la vaina radicular de Hertwig) que podrían ser dañadas también al realizar este procedimiento.⁽⁵⁾

Por eso que los irrigantes cumplen un papel importante en la desinfección del conducto radicular de los dientes permanentes inmaduros no vitales dando un máximo efecto antibacteriano y bacteriostático además de generar un mínimo efecto citotóxico en las células madres y fibroblastos presentes en el área

apical.⁽⁵⁾ Sin embargo una desventaja en el uso de este tipo de herramientas para descontaminar el conducto radicular es el riesgo de dejar residuos no biocompatibles en el conducto radicular.

- Agua oxigenada: El peróxido de hidrógeno es un antiséptico por la liberación de oxígeno radical. Por desgracia, su acción es demasiado corta y neutralizada rápidamente por los restos orgánicos. Además requiere un enjuague para reducir el dolor y posible enfisema gaseoso.
- Clorhexidina: Clorhexidina 2% fue propuesta como medicación temporaria, ya que tiene una buena acción contra bacterias gram+, sin embargo sus moléculas pueden ser absorbidas por las paredes dentinarias y quedándose hasta 12 semanas en el conducto radicular. Por eso la clorhexidina no es elegida como el irrigante de primera opción.
- Hipoclorito de sodio: Hasta ahora el hipoclorito de sodio permanece en referencia como irrigador endodóntico. Al tener efecto antiséptico ampliamente demostrado y potente acción de disolvente sobre el tejido necrótico. Las concentraciones recomendadas varían entre el 0.5% y 5.25%. Siendo su citotoxicidad proporcional a su concentración. La concentración de 2.5% parece ser la mejor opción en relación a eficiencia y falta de toxicidad.
- Yodo: Es un potente bactericida, antifúngico, antiviral, esporicida y sedante. Las secreciones purulentas y la sangre no lo inactivan, pero su desventaja en su uso es que decolora la pieza dental a marrón.
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)+ irrigantes: El EDTA es un quelante que viene a ser un ácido débil, que reaccionan con la porción mineral de las paredes dentinales, generando sustitución de iones de calcio por iones de sodio, los cuales se combinan con la dentina para dar sales solubles. El objetivo del uso de EDTA es permitir una mejor

humectabilidad y eliminación del barro dentinario. Según Treviño¹²⁶ quien estudió los efectos de irrigantes en la supervivencia de las células madre humanas de la papila apical, encontró que el EDTA permitía una supervivencia máxima de estas células. EDTA 17% se utiliza a menudo en casos de infección bacteriana para eliminar la capa de barrillo y permitir el acceso a la entrada de los túbulos de la dentina (permitiendo una mejor oportunidad de unirse a los tejidos de la regeneración) e inducir una mejor penetración del irrigador (aumenta la humectabilidad del irrigador) y medicación del canal radicular. EDTA actúa también como un sellador que maximiza el efecto bactericida y bacteriostático de los diferentes agentes. Su efecto quelante permite la liberación de los factores de crecimiento encarcelados en la dentina durante la dentinogénesis. Ring et al⁸³ encontraron que no hay supervivencia de células madres después de usar una combinación de EDTA Y 2% de Clorhexidina. Por otra parte, se forman precipitados de sales de clorhexina que se mantienen en el canal radicular, los cuales pueden ser tóxicos y pueden evitar la adhesión celular en las paredes del canal. La combinación de EDTA e hipoclorito al 6% genera moderada reducción de la vitalidad de células madre. Se recomienda enjuagar con solución salina después de irrigar con el fin de minimizar el riesgo de posibles precipitaciones y eliminar desechos residuales del irrigante.⁽⁵⁾

Con respecto a la desinfección del conducto tenemos los siguientes agentes:

- Hidróxido de calcio: Es una base fuerte, la cual tiene efecto antibacteriano debido a los iones OH^- . Dichos iones dañan las membranas citoplasmáticas, suprimiendo la actividad de la encima bacteriana, desnaturalizando proteínas, dañando el ADN, inhibiendo la replicación e inactivando endotoxinas. Sin embargo el Hidróxido de calcio no tiene poder sobre los biofilms, además que

su pH básico desnaturaliza las proteínas y podría inducir a la necrosis del tejido apical y su potencial antibacteriano se podría ver disminuido frente a residuos de necrosis pulpar y exudados inflamatorios. Por esta razón su eficacia en la desinfección se discute para la aplicación in vivo. Algunas investigaciones⁽⁶⁾ señalan que el hidróxido de calcio aumentaría la expresión de algún tipo de quinasas (señales extracelulares por la fosforilación), que son indicadores de la proliferación de las células madre de la pulpa y el ligamento,⁽⁵⁶⁾ por lo tanto usando concentraciones habituales, no sería citotóxico para las células madres y apoyarían su proliferación. Un estudio realizado en cultivos celulares, mostró el efecto directo de medicamentos intracanal sobre las células madre de la papila apical. El hidróxido de calcio debe ser usado en concentraciones de 0.01 mg/ml para desinfección de canal radicular, lo cual permite 100% de supervivencia de las células madres de la papila apical. Siendo 1mg/ml la máxima concentración que produce la supervivencia de las células madre.⁽⁵⁾

- Pasta triantibiótica: Debido a la complejidad que caracteriza la infección que se produce en el conducto radicular es poco probable que un solo antibiótico pueda esterilizar completamente el conducto, hecho demostrado por Hoshino y cols.⁽⁷⁾

Chuensombat et al⁽²⁵⁾ quienes estudiaron la eficacia antibacteriana in vitro y el efecto citotóxico de la pasta triantibiótica, señalaron que el uso de cada antibiótico usado aisladamente es menos citotóxico que el uso de la combinación. Para la eliminación de las bacterias en el canal es necesario utilizar una concentración mínima de 25µg/ml. No existen antibióticos que tengan un espectro de acción suficientemente amplio como para ser eficientes contra todos los tipos de bacterias presentes en los conductos radiculares y regiones periapicales, siendo la combinación de antibióticos esencial para cubrir un máximo rango de acción. El uso de las pastas antibióticas se debe

utilizar en adecuada concentración para evitar citotoxicidad en las células madres, ya que la citotoxicidad aumenta con la dosis. Los estudios in vitro demostraron que con una concentración de 39µg/ml sería la adecuada para lograr la desinfección del canal radicular.⁽²⁵⁾

Hoshino et al^{(7),(57)} proponen una mezcla poliantibiótica conformada por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina con propilenglicol y macrogol (pasta 3 Mix-MP) a una concentración de 20µg/ml, la cual colocada con léntulo reduce más del 99% el número de colonias bacterianas del canal radicular. La pasta triantibiótica parece ser biocompatible pero el actual problema es la posible resistencia bacteriana.

El metronidazol, componente del nitroimidazol, ofrece una amplia gama de efectos contra las bacterias anaeróbicas, protozoarios, bacilos gram-negativos y gram-positivos sin actuar contra las bacterias aeróbicas y sin inducir a la resistencia bacteriana, además de ser el único antibiótico de la mezcla que tiene un pH neutro y por tanto no tiene ninguna citotoxicidad hacia las células madres⁽²⁵⁾. La minociclina, antibiótico que pertenece al grupo de las tetraciclinas, de efecto bacteriostático, también presenta un amplio rango de actividad contra las bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas, además son efectivas contra las espiroquetas, muchos microorganismos anaeróbicos y bacterias facultativas, mientras que el ciprofloxacino, una fluoroquinolona sintética, actúa como bactericida de forma potente contra los patógenos gram-negativos, pero limitada contra los gram-positivos, y clínicamente seguro cuando se aplica en bajas dosis, además que por poseer un pH ácido no es favorable para cultivar células madres, probablemente facilita la permeabilidad celular del antibiótico, lo que mantendría la citotoxicidad a largo plazo.^{(7),(25),(58)}

El propilenglicol que es un líquido incoloro, viscoso e higroscópico, tiene las propiedades físicas similares al etilenglicol, pero menos tóxicas.⁽⁵⁹⁾

Tiene la capacidad de penetrar en la dentina más rápida y efectivamente que el agua destilada, por lo que se le indica como vehículo eficaz para distribuir un medicamento en el interior de los conductos radiculares.⁽⁵⁹⁾

El macrogol, utilizado como vehículo en farmacología dermatológica. Son productos de policondensación de óxido de etileno y agua; su consistencia varía conforme a la longitud de la cadena: el polietilenglicol 300 es líquido, el 400 es semisólido y el 4000 es sólido.⁽⁵⁹⁾

Tabla N°1.- Componentes de La mezcla poliantibiótica (3Mix-MP)⁽⁷⁾

ANTIBIOTICOS	VEHICULOS
CIPROFLOXACINO 200mg	MACROGOL
METRONIDAZOL 500mg	PROPILENGLICOL
MINOCICLINA 100mg	

Esta mezcla antibiótica es colocada en el conducto radicular con un léntulo, debemos asegurarnos que la pasta esté colocada por debajo de la unión cemento esmalte, para minimizar el posible cambio de coloración coronal. Esta fase del tratamiento se culmina con el sellado provisional del acceso coronal de 3 a 4 mm de espesor.

Los materiales a utilizar para la restauración pueden ser: IRM™, Cavit™. Ionómero de vidrio, entre otros. Se espera un periodo de 1 a 4 semanas aproximadamente.^{(7),(55)}

Después de transcurrido dicho tiempo, el paciente retorna para una evaluación. Si el diente esta asintomático y sin signos clínicos de patología, se realizará el siguiente procedimiento indicado en el protocolo de regeneración.⁽⁵⁵⁾

- **Formación de la matriz**

Una vez terminada la etapa de desinfección, se elimina el sellado provisional y la pasta antibiótica es retirada mediante irrigación profusa con 20 ml de EDTA al 17%, secar con puntas de papel. Al observar un conducto limpio y seco, sin signo de exudado inflamatorio, se introduce un explorador endodóntico o una lima endodóntica en el conducto hasta tocar el tejido vital, el objetivo es lograr un sobrepaso de 2 mm para crear sangrado dentro del canal hasta el nivel de la unión cemento esmalte, mediante la aplicación de presión con una torunda humedecida en solución salina esterilizada, dejamos por 15 min a que se consolide el coágulo o apoyo biológico para regenerar la pulpa. Una vez formado el coágulo, se debe colocar una matriz reabsorbible como Colla Plug™, Colla Cote™, Colla Tape™ u otro material sobre el coagulo de ser necesario, luego colocamos MTA o CaOH como material de recubrimiento y por ultimo sellar el acceso con ionómero de vidrio (3-4mm)^{(17),(55)}.

- **Seguimiento**

Se recomienda realizar exámenes clínicos y radiográficos.

Para evaluar la efectividad del tratamiento debemos tener en cuenta lo siguiente:

- No dolor, no inflamación de tejidos blandos ni trayectos fistulosos.
- Se debe observar resolución de la radiolucidez apical entre los 6-12 meses después del tratamiento.
- Mayor ancho de las paredes de las raíces(generalmente esto se observa antes del aumento de la longitud de la raíz, y se produce entre los 12-24 meses después del tratamiento)
- Mayor longitud de la raíz
- Prueba de vitalidad pulpar.

El grado de éxito de los procedimientos regenerativos en endodoncia generalmente se miden por el grado en que es posible alcanzar los diferentes objetivos:

- Objetivo principal: Eliminación de los síntomas y evidencia de cicatrización ósea.
- Objetivo secundario: Aumento del espesor de la pared de la raíz y/o aumento de la longitud de la raíz. (deseable pero quizás no esencial).
- Objetivo terciario: Respuesta positiva a las pruebas de vitalidad.⁽⁵⁵⁾

3.2.4.4 Indicaciones de la terapia de regeneración pulpar

Los casos indicados para realizar terapia de regeneración pulpar son los siguientes:⁽⁶⁰⁾

- Dientes con lesiones traumáticas que han generado necrosis pulpar, o una pulpa parcialmente necrótica e infectada.
- Dientes con anomalías de desarrollo (geminación, concrescencia, dens evaginatus)
- Dientes permanentes inmaduros con comunicación entre el tejido pulpar y tejido perirradicular.

Para el caso de necrosis pulpar por caries dental la indicación de la terapia de regeneración pulpar aún es cuestionada, ya que los resultados de la terapia aún son poco predecibles.⁽⁶⁰⁾

3.2.4.5 Ventajas de la terapia de regeneración pulpar

Según estudios y reportes de casos de Trope⁽¹⁵⁾, Reynolds⁽¹⁷⁾, Banchs⁽¹²⁾, Iwaya⁽¹⁶⁾, entre otros; las ventajas de la regeneración pulpar son:

- Fomenta el desarrollo radicular continuo.
- Reforzar las paredes dentinarias, agrandando el ancho de las mismas.
- Menor número de consultas, 2 o 3 consultas en total, en un periodo de pocas semanas.

- El tiempo operatorio es más corto, lo que genera menor ansiedad en el paciente pediátrico.
- Abaratamiento de costos.
- La obturación del canal no es obligatoria.

3.2.4.6 Desventajas de la terapia de regeneración pulpar

Sólo hay algunas limitaciones de la revascularización:⁽⁵⁵⁾

- Los resultados clínicos a largo plazo todavía no están disponibles.
- Es posible que todo el conducto pudiera calcificarse, comprometiendo la estética y aumentando potencialmente la dificultad de realizar procedimientos endodónticos futuros, si son necesarios.

En el caso de contemplar la posibilidad a futuro de la colocación de postes y coronas en el plan de tratamiento restaurador final, la regeneración no es la opción de tratamiento adecuado debido a que el tejido vital en dos tercios apical del canal no puede ser invadido por la colocación del poste.

- Pigmentación de la corona del diente, causada por la tetraciclina, uno de los componentes de la pasta poliantibiótica.⁽¹⁷⁾

3.2.4.7 Contraindicaciones

Hasta la actualidad no se ha reportado nada al respecto, lo que si reportan son algunos resultados negativos en animales, como son formación de tejidos que no son de origen pulpar al interior del conducto radicular, y las desventajas en su uso.^(9, 17, 55)

3.2.4.8 Mecanismos de la terapia de regeneración pulpar

Existen 5 mecanismos por los cuales puede ocurrir la regeneración del tejido pulpar:

1. Es posible que algunas células de pulpa vital permanezcan en el extremo apical del conducto radicular. Estas células pueden proliferar en la matriz

recién formada y diferenciarse en odontoblastos bajo la organización e influencia de las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig, que son muy resistentes a la destrucción, incluso en presencia de inflamación. Los odontoblastos recién formados pueden fijarse en la dentina atubular en el extremo apical, causando apexogénesis (alargamiento de la raíz), así como en las paredes laterales de la dentina del conducto radicular, reforzando y fortaleciendo la raíz.^{(12), (54)}

2. Otro posible mecanismo de desarrollo continuo de las raíces podría deberse a las células madre multipotenciales de la pulpa dental, que están presentes en dientes permanentes y pueden estar presentes en abundancia en los dientes inmaduros. Estas células del extremo apical podrían ser cabeza de serie existente en las paredes dentinales y pueden diferenciarse en odontoblastos y depositar dentina terciaria.^{(52), (61)}
3. El tercer posible mecanismo podría ser atribuido a la presencia de células madre en el ligamento periodontal, que pueden proliferar, crecer en el extremo apical (ápice) y dentro del conducto radicular, y depositar tejido duro, tanto en el ápice y como en las paredes laterales. La evidencia que soporta esta hipótesis es presentada por la documentación de cemento y las fibras de Sharpey en los tejidos recién formados.^{(52), (62)}
4. El cuarto mecanismo posible para el desarrollo radicular puede ser atribuido a las células madre de la papila apical o la médula ósea. La instrumentación más allá de los confines del conducto radicular para inducir sangrado también puede transportar células madre mesenquimales del hueso hacia el lumen del conducto. Estas células tienen gran capacidad de proliferar. Estudios de trasplantes han demostrado que las células madre humanas de hueso reducido pueden formar hueso o dentina in vivo.^{(52), (61)}

5. Otro mecanismo posible es que el coágulo de sangre en sí, siendo una rica fuente de factores de crecimiento, podría desempeñar un papel importante en la regeneración. Estos incluyen el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE), el factor de crecimiento epitelial derivado de las plaquetas, y el factor de crecimiento tisular; los cuales podrían estimular la diferenciación, crecimiento y maduración de los fibroblastos, odontoblastos, cementoblastos, etc. de las células inmaduras, células mesenquimales indiferenciadas en la matriz de tejido recién formada. La expresión de FCVE en dientes permanentes inmaduros y maduros se ha documentado ampliamente.^{(52),(61)}

3.3 Definición de términos

- **Efecto Antibacteriano:** El efecto antibacteriano se define como la capacidad de matar, inhibir y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.⁽⁶³⁾
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la menor cantidad del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo y generalmente se expresa en µg/ml.⁽⁶⁴⁾
- **Concentración Mínima Bactericida (CMB):** Es la menor concentración del agente antimicrobiano que permite sobrevivir a menos del 0.1% del inóculo original.⁽⁶⁴⁾
- **Droga:** Sustancia mineral, vegetal o animal, que se emplea en la medicina, en la industria o en las bellas artes.⁽⁶⁵⁾
- **MP:** mezcla preparada a base de macrogol (polietilenglicol) y propilenglicol.⁽⁶⁶⁾
- **3Mix:** mezcla de 3 drogas: ciprofloxacino, metronidazol, minociclina.⁽⁶⁶⁾

3.4 Hipótesis

- Existe efecto antibacteriano in vitro de la combinación de drogas 3Mix y MP y de sus combinaciones alternativas sobre las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

3.5 Operacionalización de variables

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICION	CATEGORIA
Variable Independiente	3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina)	Solución a base de antibióticos	Concentración de drogas	Ordinal	25% 6,25% 1,56% 0,39% 0,195% 0,097%
	3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor)	Solución a base de antibióticos	Concentración de drogas		
	3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina)	Solución a base de antibióticos	Concentración de drogas		
	Droga Macrogol (Vehículo)	Polímero lineal de óxido de etileno	Halo de crecimiento bacteriano (medido en mm. de diámetro)	Intervalo	Sensibilidad Nula(-): ≤ 8mm
	Droga Propilenglicol (Vehículo)	Líquido incoloro viscoso e higroscópico			Sensibilidad límite (+): 9 a 14mm
	Droga Macrogol + Propilenglicol (Vehículos)	Combinación de sustancias			Sensibilidad Media (++) : 15 a 19mm Sumamente sensible (+++): ≥ 20mm

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	CATEGORIA
Variable Dependiente	Efecto sobre bacterias anaerobias	Capacidad de ciertas sustancias químicas, que matan o impiden el crecimiento de bacterias sensibles a ellas.	Concentración Mínima Inhibitoria	Efecto en 25%	Nominal	Si No
				Efecto en 6,25%	Nominal	Si No
				Efecto en 1,56%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,39%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,195%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,097%	Nominal	Si No
			Concentración Bactericida Mínima	Efecto en 25%	Nominal	Si No
				Efecto en 6,25%	Nominal	Si No
				Efecto en 1,56%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,39%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,195%	Nominal	Si No
				Efecto en 0,097%	Nominal	Si No

IV. METODOLOGIA

4.1 Tipo de investigación

- Descriptivo
- Prospectivo
- Transversal
- In vitro

4.2 Población y muestra

a) Muestra de Estudio:

- Cepa identificada de:

Fusobacterium nucleatum ATCC® 25586

Enterococcus faecalis ATCC® 29212

- Combinación de drogas a diferentes concentraciones 25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 1,56 µg/ml, 0,39 µg/ml, 0,195 µg/ml, 0,097 µg/ml.
- Vehículos: Macrogol, Propilenglicol y su combinación.

b) Criterios de Inclusión:

- Bacterias anaerobias estrictas presentes en dientes permanentes jóvenes con necrosis pulpar.^{(67),(68)}

c) Tamaño de muestra y Tipo de muestreo:

- Microorganismos anaerobios estrictos.
- Muestreo no probabilístico por conveniencia.

4.3 Procedimientos y técnica

4.3.1 Obtención de las soluciones:⁽⁵⁹⁾

Para la preparación de cada una de las soluciones, se partió de una solución stock de cada antibiótico de 1mg/ml. La cual estuvo compuesta por cada uno de los antibióticos pulverizados en su forma pura como polvos: metronidazol (Fluka, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), minociclina (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), ciprofloxacino (Fluka, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), amoxicilina (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), cefaclor (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) y agua estéril y alcohol de 92,8° como solventes.

- Solución de Metronidazol en agua estéril y alcohol (0,01g/10ml), donde 9ml fueron agua y 1ml alcohol.
- Solución de Minociclina en agua estéril (0,01g/10ml)
- Solución de Ciprofloxacino en agua estéril (0,01g/10ml)
- Solución de Cefaclor en agua estéril (0,01g/10ml)
- Solución de Amoxicilina en agua estéril (0,01g/10ml)

Todas las cantidades fueron estrictamente pesadas en una balanza electrónica de precisión (Marte®, 0.001g, Brasil) y colocadas en un tubo de

ensayo estéril para la posterior incorporación de sus respectivos solventes. Luego se procedió a homogenizar cada una de las mezcla con un agitador shaker tipo vórtex (Benchmark®, 200-3200 rpm, USA).

Para obtener las drogas 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina a las diferentes concentraciones se procedió a mezclar una cantidad equivalente de cada una de las soluciones obtenidas según grupo, y así obtener la concentración deseada de la mezcla de drogas (25 µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097 µg/ml).

- Solución de 3Mix (solución de metronidazol + solución de ciprofloxacino + solución de minociclina)
- Solución de 3Mix-Cefaclor (solución de metronidazol + solución de ciprofloxacino + solución de cefaclor)
- Solución de 3Mix-Amoxicilina: (solución de metronidazol + solución de ciprofloxacino + solución de amoxicilina)

Para obtener los vehículos, se utilizó:

- Propilenglicol (Adeka®, Japan)
- Macrogol (Polietilenglicol 400+4000, Sanyo Chemical®, Japan)
- Propilenglicol + Macrogol (mezcla de ambas drogas)

4.3.2 Obtención del material biológico:

Se utilizó 2 cepas bacterianas estándares ATCC (American Type Culture Collection)

- *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586
- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212

Las cepas ATCC se mantuvieron en condiciones de refrigeración normal (2 – 8 °C) desde el momento de su adquisición hasta su reactivación en el Laboratorio de Anaerobios del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (Sao Paulo-Brasil). Las cepas estuvieron contenidas en sus respectivos envases Kwik – Stick™, para luego ser sembradas en un medio de cultivo enriquecido según las condiciones descritas en la tabla N°1. Luego de la siembra los tubos fueron colocados en un desecador para vacío de vidrio (Corning®, 7.5L, Alemania), para generar condiciones de anaerobiosis se utilizó un motor Megavac Vacuum Pump (Cenco®, 0.125 HP, USA), nitrógeno comprimido (Gama Gases®, UN 1066 nitrógeno comprimido, 2.2, Brasil) y mixtura de gases (Gama Gases®, UN 1956- 90%nitrógeno+10%co₂, Brasil). Siendo dos exposiciones de nitrógeno comprimido y una de mixtura de gases.

Tabla N°2.- Cultivo de cepas bacterianas ATCC

Microorganismo	Medio de cultivo	Tiempo	Incubación
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI)	48 horas	Anaerobiosis
<i>Enterococcus faecalis</i>	Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI)	24 horas	Anaerobiosis

Una vez reactivadas las cepas, se realizó una coloración Gram a cada una de ellas como procedimiento confirmatorio.

Luego se procedió a colocarlas en un medio selectivo (BHI), dejándolas crecer en condiciones de anaerobiosis por espacio no mayor a 24 horas.

4.3.3 Prueba de susceptibilidad antibiótica

Para determinar la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos, se utilizó el método de dilución en caldo.

Este es un método cuantitativo, considerado de referencia, ya que permite determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).⁽⁶⁴⁾

4.3.3.1 Procedimiento

- Se procedió a preparar una serie de tubos con 5ml de medio de cultura (TSB) enriquecido con extracto de levadura, los cuales fueron debidamente esterilizados con autoclave (Fabbe-Primar®, 70L, Brasil).
- Luego de obtener los tubos que contenían el medio de cultura, se procedió a rotularlos según:
 - ✓ Grupo de experimentación (Grupo 3Mix, 3Mix-Amoxicilina, 3 Mix-Cefaclor; Control).
 - ✓ Concentración (25 µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097 µg/ml)
 - ✓ Grupo bacteriano (*Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*)
- Para obtener el grupo de experimentación, colocamos cantidades iguales de cada solución de antibióticos según el grupo correspondiente ^{(14),(22, 25, 26)}. Las cantidades que se debe colocar de cada solución de droga fueron determinadas previamente, con la finalidad de obtener las concentraciones finales de drogas en 25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml por cada grupo de experimentación.
- Para obtener el grupo Control, se preparó una suspensión con 5mL de caldo TSB para cada bacteria procedente de un cultivo menor de 24

horas, se ajustó hasta obtener una dilución de 0,5 en la escala turbimétrica de Mc Farland que es equivalente a 10^8 UFC/ml

- Para concluir inoculamos 100µL de bacteria a cada tubo, según grupo bacteriano.
- Todos los tubos fueron incubados en condiciones de anaerobiosis, para su posterior lectura.

La lectura de los tubos se realizó por método visual. Primero se observó el tubo testigo (tubo control) compuesto solamente por caldo TSB y la bacteria, el cual tuvo desarrollo bacteriano corroborándolo mediante los siguientes indicadores: turbidez, película o sedimento. Luego se observó cuál fue el primer tubo de la serie que presenta las mismas características de nuestro tubo testigo. Por tanto el tubo anterior a este (último tubo de la serie que no presenta dichas características) es el que correspondería a la concentración inhibitoria mínima (CIM).⁽⁶⁴⁾

Los tubos que contenían el *Enterococcus faecalis* fueron leídos a las 24 horas y los que contenían el *Fusobacterium nucleatum* fueron leídos a las 48 horas de incubación.

De cada uno de los tubos con caldo que no presentó turbidez luego de la incubación, se procedió a sembrar 25 µL de cada uno directamente en el agar de placas con agar sangre y se colocó en condiciones de anaerobiosis. Las lecturas se realizaron a las 24 horas para el caso de *Enterococcus faecalis* y 48 horas para *Fusobacterium nucleatum*. Determinando así la menor concentración de las combinaciones de drogas que fueron capaces de matar al 99,9% de bacteria. Esto se denomina Concentración Bactericida mínima (CBM).⁽⁶⁴⁾

4.3.4 Prueba de susceptibilidad de los vehículos

4.3.4.1 Procedimiento

- Para testar los vehículos se conformaron 3 grupos para cada tipo de bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*).
 - ✓ Grupo A: Propilenglicol
 - ✓ Grupo B: Macrogol
 - ✓ Grupo A+B: Propilenglicol + Macrogol
- Se utilizó 100µL de inóculo bacteriano (con menos de 24 horas de crecimiento), los cuales fueron sembrados con un asa de Drigalsky en placas que contenían agar sangre.
- Luego se colocó 20µL de los vehículos según grupo con una micropipeta directamente en el agar sangre.
- Todas las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis, para su posterior lectura a las 48 horas
- El procedimiento se realizó por duplicado.

4.4 Procesamientos de datos

Los datos de las observaciones de la combinación de drogas se organizaron para cada una de las cepas y las concentraciones utilizadas según la ficha recolección de datos N°1 (Ver anexo N°1) y para medir los halos formados por los vehículos se utilizó un vernier digital calibrado (Digital Caliper 0-1500mm), colocándolo sobre la superficie de la placa Petri y con luz refleja en milímetros. Los datos fueron consignados en la ficha de recolección de datos N°2 (Ver anexo N°2).

Para la interpretación de los resultados de los vehículos se utilizó la evaluación tanto cuantitativamente por medición numérica de los halos de inhibición y cualitativamente siguiendo las pautas por Duraffourd.⁽⁶⁹⁾

- Sensibilidad Nula (-), para un diámetro inferior o igual a 8mm.
- Sensibilidad limite (+), para un diámetro comprendido entre 9 a 14 mm.
- Sensibilidad Medio (++), para un diámetro entre 15 y 19 mm.
- Sumamente sensible (+++), para un diámetro superior o igual a 20 mm

4.5 Análisis de resultado

Los datos fueron organizados en tablas y gráficas. Para el análisis se comparó los resultados obtenidos del efecto antibacteriano de cada una de las combinaciones de droga frente a las diferentes cepas.

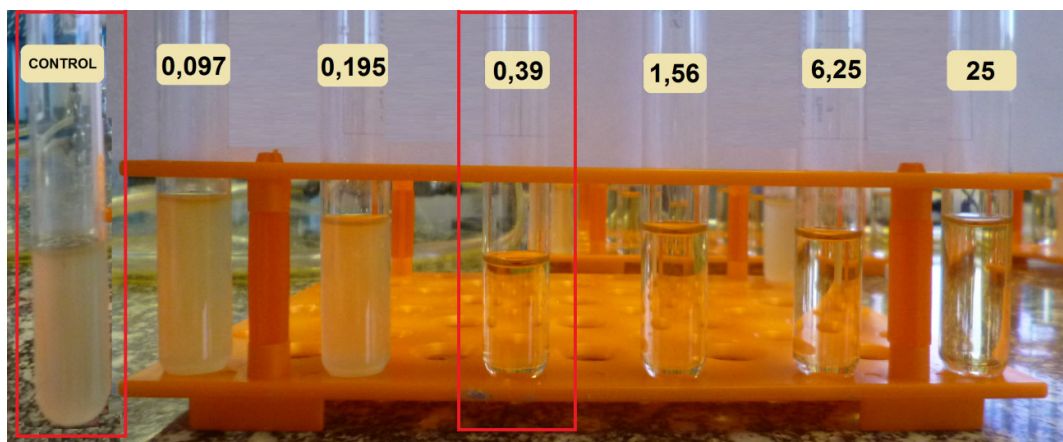
Debido a la complejidad de la metodología empleada, y el costo, el análisis de resultados y conclusiones se limitan a describir el impacto de las concentraciones de las combinaciones de drogas utilizado sobre las bacterias empleadas. El experimento se repitió por duplicado, teniendo un tamaño de muestra 2, lo cual no permite realizar cálculos estadísticos, sólo descriptivos.

V. RESULTADO

5.1 Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) de combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

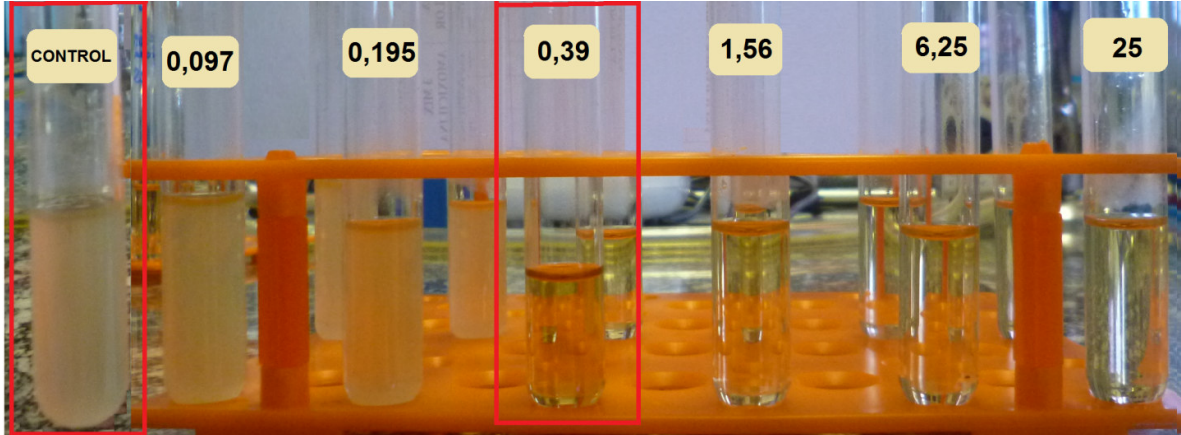
Se estudió el efecto antibacteriano mediante la inhibición del crecimiento de las cepas en estudio por parte de la combinación de droga 3 Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina en sus diferentes concentraciones, teniendo como referente un control (Tubo testigo, compuesto solamente por caldo TSB y la bacteria en estudio).

Figura N°9.- Tubos de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



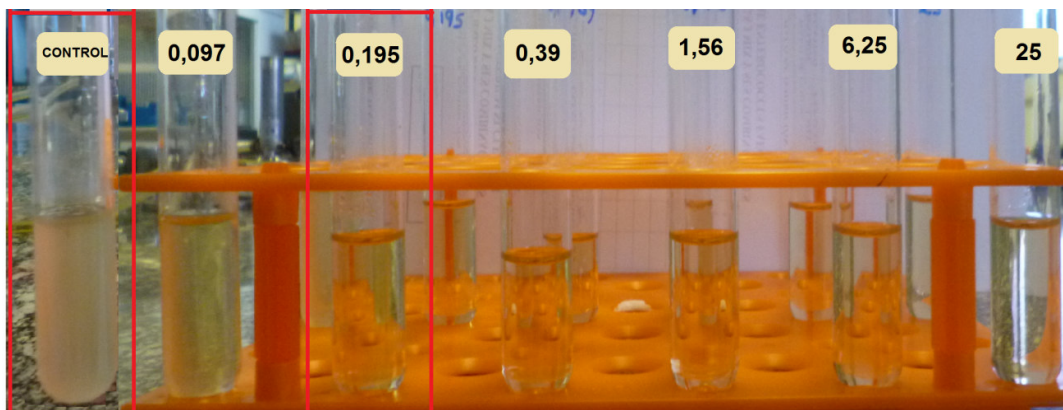
Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,195µg/ml de droga 3Mix la bacteria fue resistente, es decir hubo crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) corresponde a 0,39µg/ml. Siendo esta concentración, la mínima concentración requerida para inhibir el crecimiento del *Enterococcus faecalis*.

Figura N°10.- Tubos de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



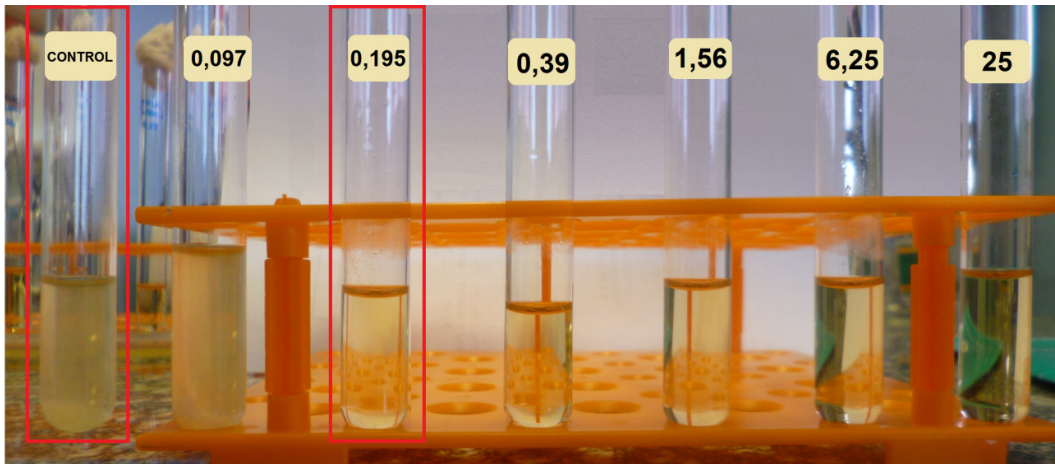
Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,195µg/ml de droga 3Mix-Cefaclor la bacteria fue resistente, es decir hubo crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) corresponde a 0,39µg/ml. Siendo esta concentración, la mínima concentración requerida para inhibir el crecimiento del *Enterococcus faecalis*.

Figura N°11.- Tubos de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



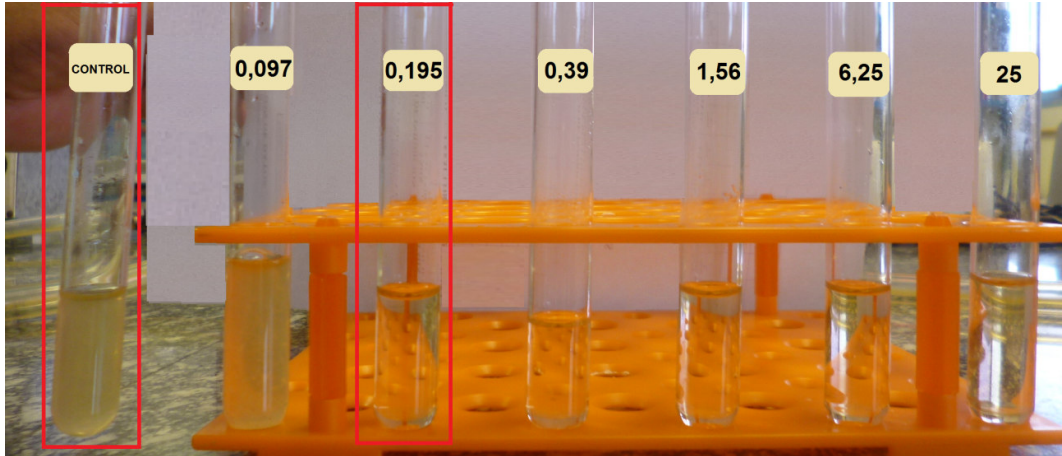
Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,097µg/ml de droga 3Mix-Amoxicilina la bacteria fue resistente, es decir hubo crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) corresponde a 0,195µg/ml. Siendo esta concentración, la mínima concentración requerida para inhibir el crecimiento del *Enterococcus faecalis*.

Figura N°12.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



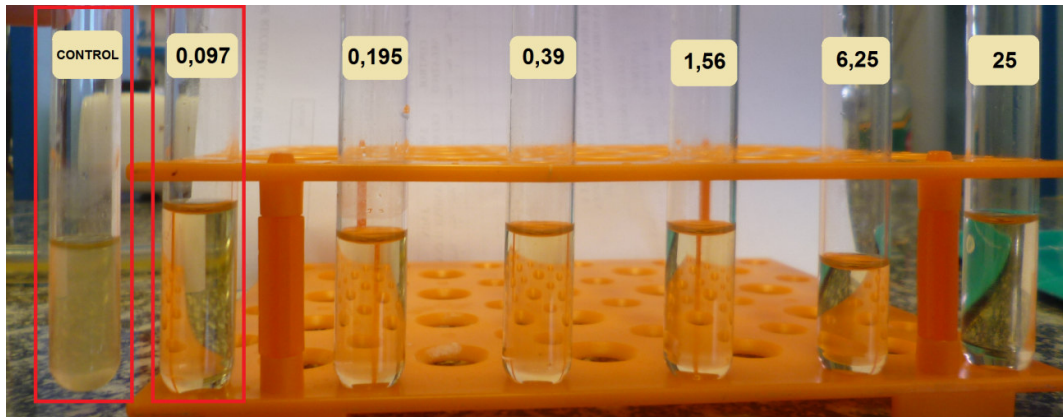
Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,097µg/ml de droga 3Mix la bacteria fue resistente, es decir hubo crecimiento bacteriano de *Fusobacterium nucleatum*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) corresponde a 0,195µg/ml. Siendo esta concentración, la mínima concentración requerida para inhibir el crecimiento del *Fusobacterium nucleatum*.

Figura N°13.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,097µg/ml de droga 3Mix-Cefaclor la bacteria fue resistente, es decir hubo crecimiento bacteriano de *Fusobacterium nucleatum*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) corresponde a 0,195 µg/ml. Siendo esta concentración, la mínima concentración requerida para inhibir el crecimiento del *Fusobacterium nucleatum*.

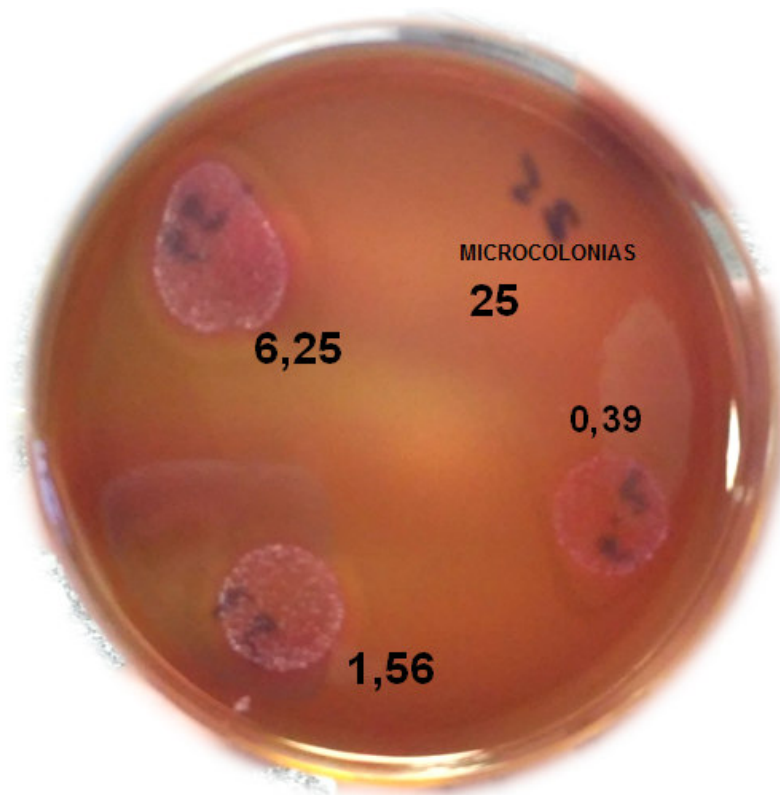
Figura N°14.- Tubos de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) a diferentes concentraciones (25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097µg/ml).



Obtuvimos para ambas repeticiones que a una concentración de 0,097µg/ml de droga 3Mix-Amoxicilina la bacteria fue sensible, es decir no hubo crecimiento bacteriano de *Fusobacterium nucleatum*, por ende la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue $\leq 0,097\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto valores inferiores hasta esta concentración son los mínimos requeridos para inhibir el crecimiento del *Fusobacterium nucleatum*.

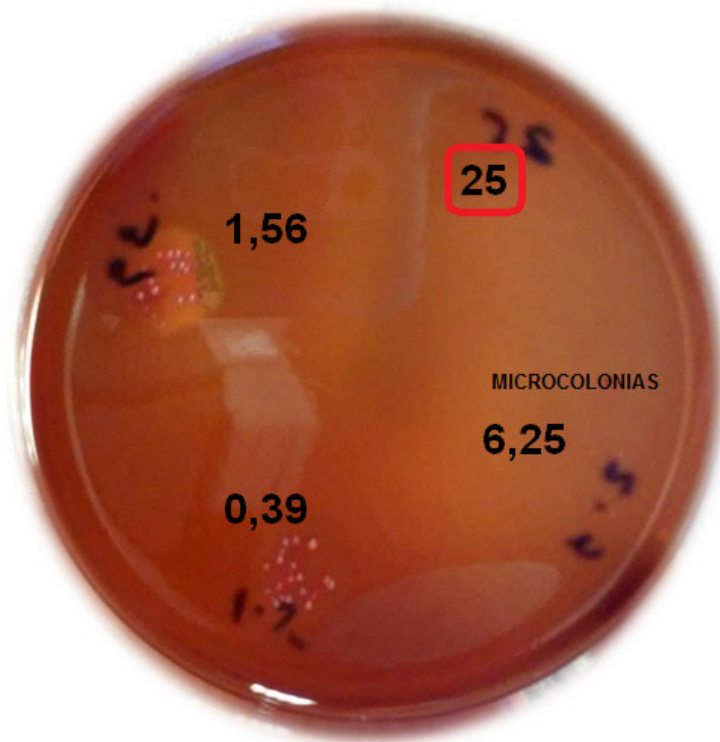
5.1 Determinación de concentración bactericida mínima (CBM) de combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Figura N°15.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml.



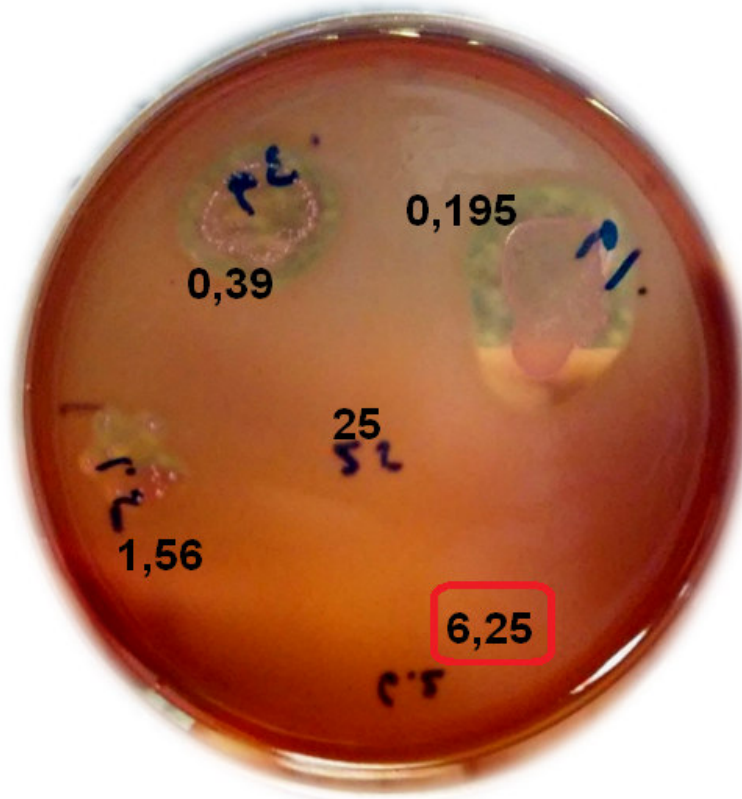
Se evidenció la formación de colonias de *Enterococcus faecalis* para las concentraciones de 6,25 µg/ml; 1,56 µg/ml y 0,39 µg/ml, mientras que para la concentración de 25 µg/ml se evidenció la formación de microcolonias, por lo tanto la concentración bactericida mínima (CBM) fue >25 µg/ml. Es decir los valores superiores a esta concentración son los mínimos requeridos para matar al 99,9% de *Enterococcus faecalis*.

Figura N°16.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml.



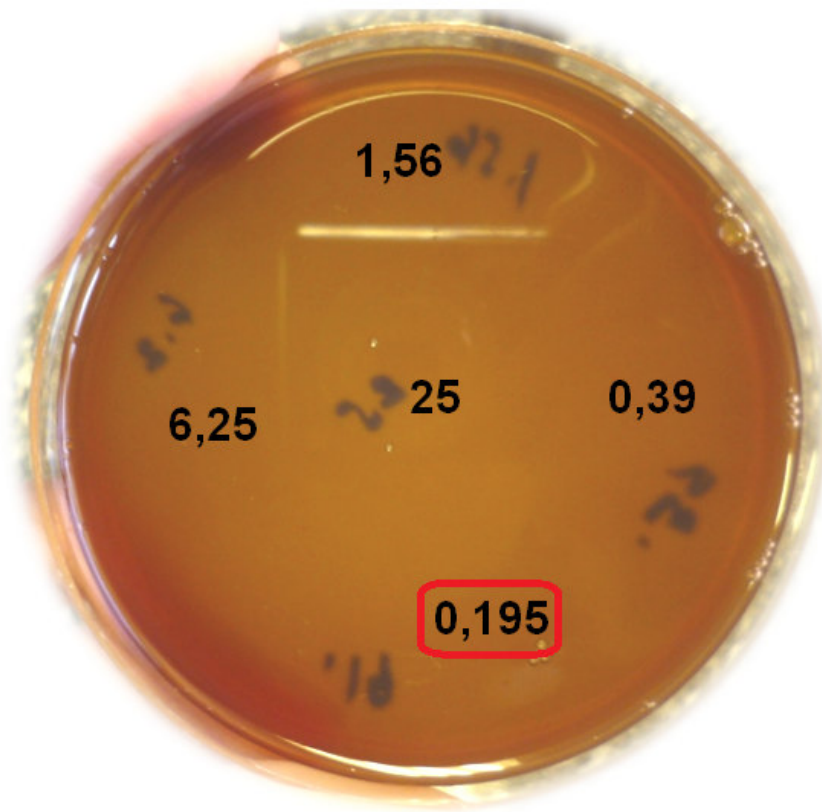
Se evidenció la formación de colonias de *Enterococcus faecalis* para las concentraciones de 1,56µg/ml y 0,39µg/ml, mientras que para la concentración de 6,25 µg/ml se evidenció la formación de microcolonias y no se evidenció formación de colonias para la concentración de 25µg/ml. Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CBM) corresponde a 25µg/ml. Es decir esta concentración es la mínimo requerida para matar al 99,9% de *Enterococcus faecalis*.

Figura N°17.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml.



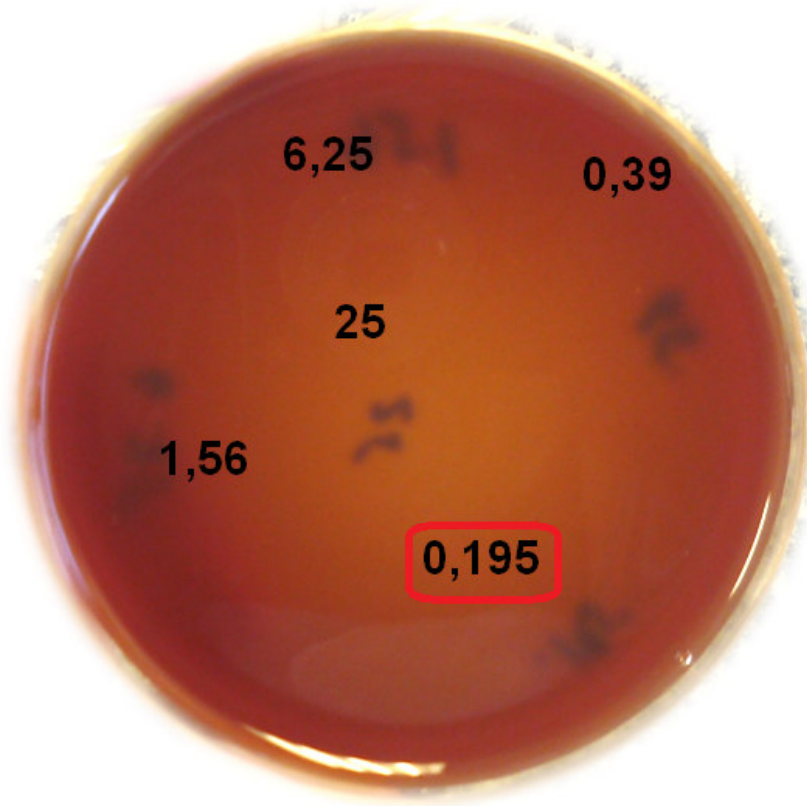
Se evidenció la formación de colonias de *Enterococcus faecalis* para las concentraciones de 1,56 µg/ml y 0,39 µg/ml, mientras que no se evidenció formación de colonias para la concentración de 25 µg/ml y 6,25 µg/ml. Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CBM) corresponde a 6,25 µg/ml. Es decir esta concentración es la mínimo requerida para matar al 99,9% de *Enterococcus faecalis*.

Figura N°18.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix (metronidazol, ciprofloxacino, minociclina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml.



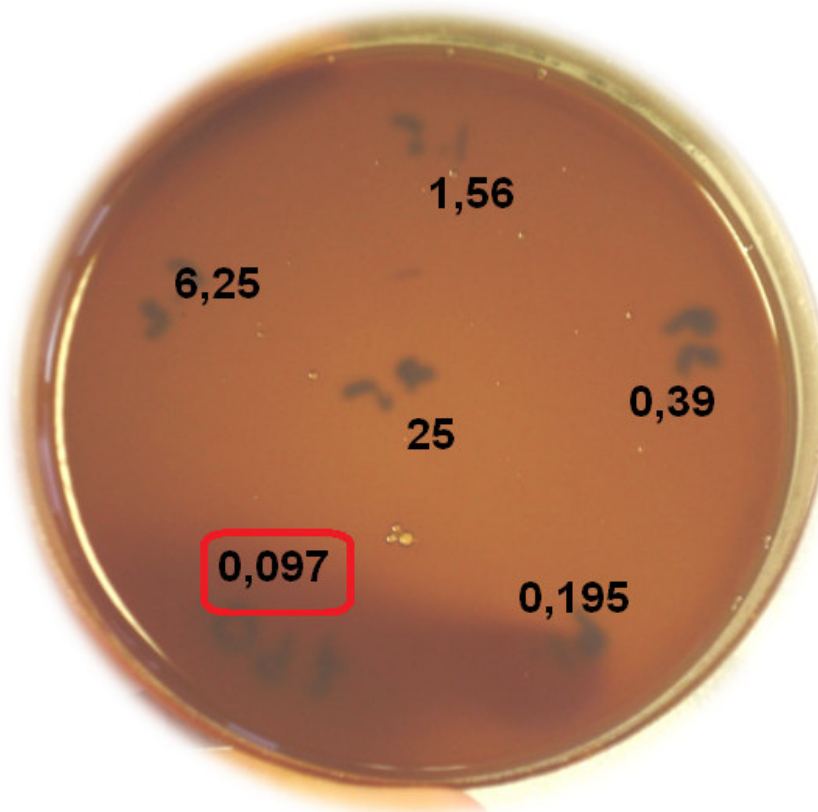
Se evidenció que no hubo formación de colonias ni microcolonias para todas las concentraciones testadas. Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CBM) coincide con la concentración inhibitoria mínima (MIC). Es decir 0,195 µg/ml fue la mínima concentración que inhibió y mató al 99.9% de *Fusobacterium nucleatum*.

Figura N°19.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Cefaclor (metronidazol, ciprofloxacino, cefaclor) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml.



Se evidenció que no hubo formación de colonias ni microcolonias para todas las concentraciones testadas. Por lo tanto la concentración bactericida mínima (CBM) coincide con la concentración inhibitoria mínima (CIM). Es decir 0,195 µg/ml fue la mínima concentración que inhibió y mató al 99.9% de *Fusobacterium nucleatum*.

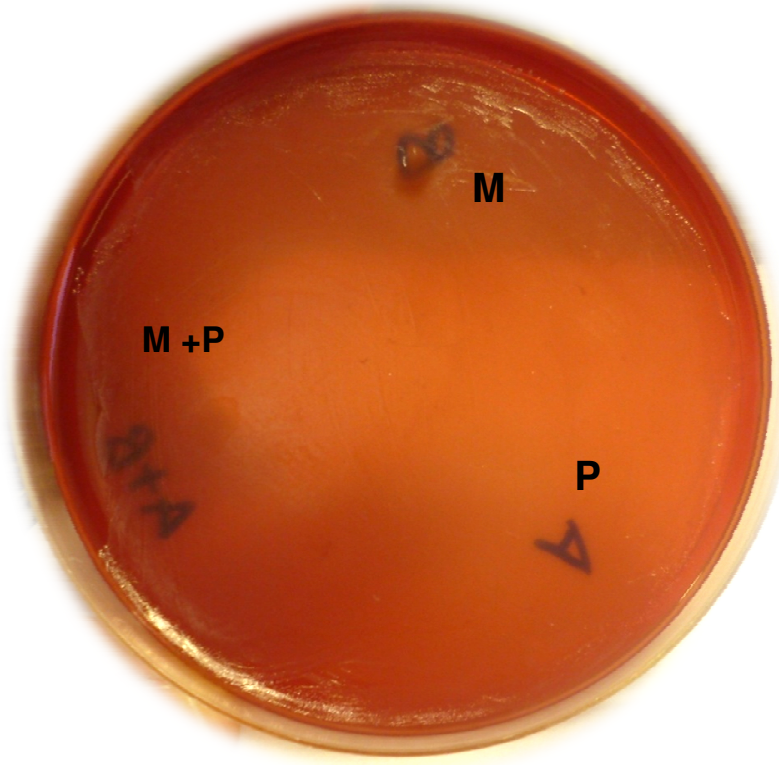
Figura N°20.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* en TSB con combinación de droga 3Mix-Amoxicilina (metronidazol, ciprofloxacino, amoxicilina) de las concentraciones de 25µg/ml; 6,25µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,39 µg/ml; 0,195 µg/ml; 0,097 µg/ml.



Se evidenció que no hubo formación de colonias ni microcolonias para todas las concentraciones testadas. Siendo la concentración bactericida mínima (CBM) coincidente con la concentración inhibitoria mínima (CIM). Por lo tanto a una concentración $\leq 0,097 \mu\text{g/ml}$ de droga 3Mix-Amoxicilina fue capaz de inhibir y matar al 99.9% de *Fusobacterium nucleatum*.

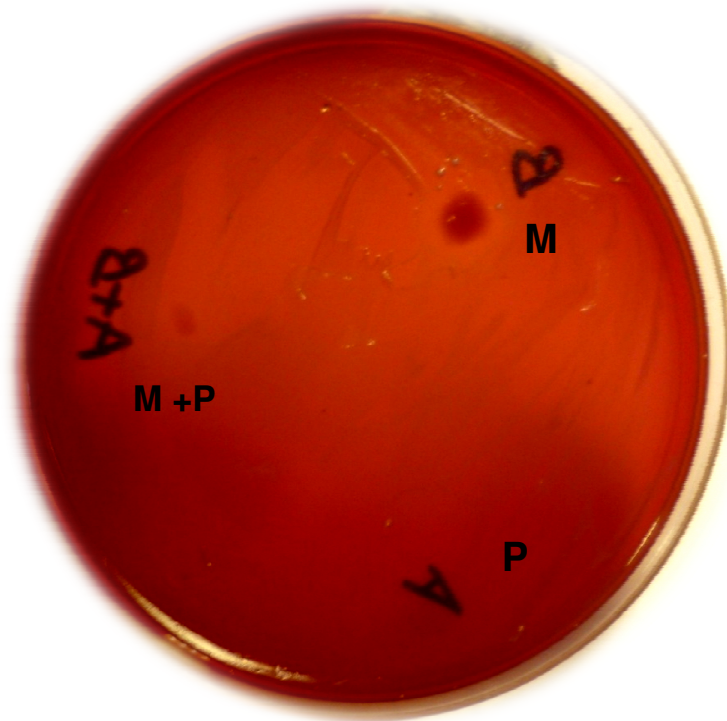
5.2 Efecto antibacteriano de vehículos sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Figura N°21.- Placas de agar sangre con inóculo de *Enterococcus faecalis* con macrogol, propilenglicol y su combinación.



Para las 2 muestras se evidenció inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis* para el grupo macrogol y combinación de macrogol y propilenglicol, generando un pequeño halo de inhibición para ambos grupos, siendo el del grupo macrogol ligeramente mayor que el grupo de la combinación de los vehículos. Para el grupo propilenglicol no se evidenció inhibición del crecimiento bacteriano.

Figura N°22.- Placas de agar sangre con inóculo de *Fusobacterium nucleatum* con macrogol, propilenglicol y su combinación.



Para las 2 muestras se evidenció inhibición del crecimiento de *Fusobacterium nucleatum* para el grupo macrogol y combinación de macrogol y propilenglicol, generando un pequeño halo de inhibición para ambos grupos, siendo el del grupo macrogol ligeramente mayor que el grupo de la combinación de los vehículos. Para el grupo propilenglicol no se evidenció inhibición del crecimiento bacteriano.

5.3 Tablas y gráficos de resultados

Tabla N°3.- Determinación de concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Concentración (µg/ml)	Muestra de trabajo	Crecimiento Bacteriano	
		<i>E. faecalis</i>	<i>F. nucleatum</i>
25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
6,25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
1,56	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,39	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,195	Tubo N°1	SI	No
	Tubo N°2	SI	No
0,097	Tubo N°1	SI	SI
	Tubo N°2	SI	SI
Control		SI	SI

Se observa para ambas muestras que a partir de la concentración 0,195µg/ml hay crecimiento de *E. faecalis* por lo que la CIM se hace evidente en 0,39µg/ml, mientras que a partir de la concentración de 0,097µg/ml crece *F. nucleatum*, dando la CIM en 0,195µg/ml.

Tabla N°4.- Determinación de concentración inhibitoria mínima de droga
3Mix-Cefaclor sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Concentración (µg/ml)	Muestra de trabajo	Crecimiento Bacteriano	
		<i>E. faecalis</i>	<i>F. nucleatum</i>
25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
6,25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
1,56	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,39	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,195	Tubo N°1	Si	No
	Tubo N°2	Si	No
0,097	Tubo N°1	Si	Si
	Tubo N°2	Si	Si
Control		Si	Si

Se observa para ambas muestras que a partir de la concentración 0,195µg/ml hay crecimiento de *E. faecalis* por lo que la CIM se hace evidente en 0,39µg/ml, mientras que a partir de la concentración de 0,097µg/ml crece *F. nucleatum*, dando la CIM en 0,195µg/ml.

Tabla N°5.- Determinación de concentración inhibitoria mínima de droga

3Mix- Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Concentración (µg/ml)	Muestra de trabajo	Crecimiento Bacteriano	
		E. faecalis	F. nucleatum
25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
6,25	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
1,56	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,39	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,195	Tubo N°1	No	No
	Tubo N°2	No	No
0,097	Tubo N°1	Si	No
	Tubo N°2	Si	No
Control		Si	Si

Se observa para ambas muestras que a partir de la concentración 0,097µg/ml hay crecimiento de *E. faecalis* por lo que la CIM se hace evidente en 0,195µg/ml, mientras que en la concentración de 0,097µg/ml no hay crecimiento de *F. nucleatum*, siendo esta la menor concentración testada, la CIM vendría a ser ≤0,097µg/ml.

Tabla N°6.- Comparación de concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



Bacteria	CIM (µg/ml)			CBM (µg/ml)		
	3Mix	3Mix Cefaclor	3Mix Amoxicilina	3Mix	3Mix Cefaclor	3Mix Amoxicilina
<i>E. faecalis</i>	0,39	0,39	0,195	>25	25	6,25
<i>F. nucleatum</i>	0,195	0,195	≤ 0,097	0,195	0,195	≤ 0,097

Se observa que la droga 3Mix-Amoxicilina es más efectiva contra las cepas estudiadas, al necesitar menos concentración para inhibir el crecimiento, al igual que para matar completamente a las cepas.

La actividad antibacteriana de la droga 3Mix-Cefaclor fue similar a la de la droga 3Mix, obteniendo una misma concentración para inhibir el crecimiento, sin embargo para *E. faecalis* la droga 3Mix-Cefaclor mostró mejor efecto para matar completamente la cepa ya que a una menor concentración logro matar al 99,9% de la bacteria.

Se encontró que la mínima concentración para inhibir el crecimiento en *F. nucleatum* logró tener un efecto bactericida al mismo tiempo.

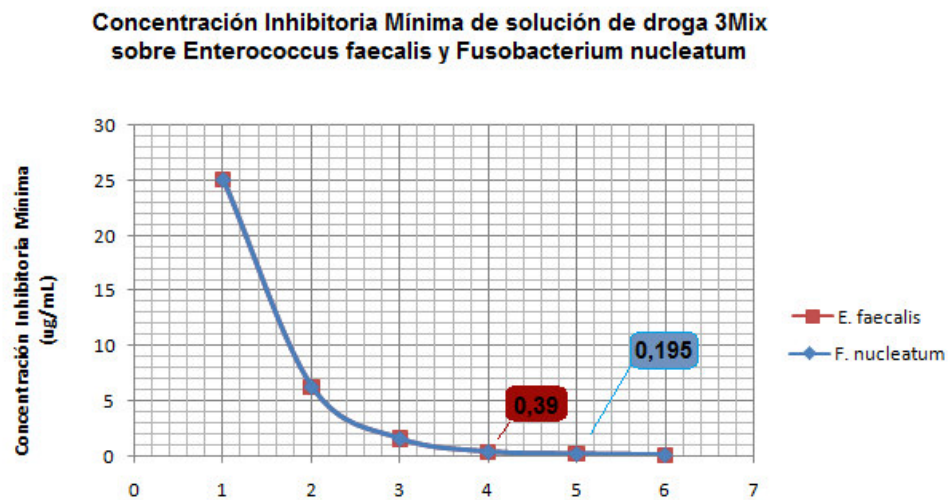
Tabla N°7.- - Halos de inhibición de vehículos sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Vehículo		Halo de inhibición			
		<i>E. faecalis</i>		<i>F. nucleatum</i>	
Propilenglicol	Placa N°1	0mm	0mm	0mm	0mm
	Placa N°2	0mm		0mm	
Macrogol	Placa N°1	4,22mm	4,11mm	6,00mm	5,89mm
	Placa N°2	3,99mm		5,78mm	
Propilenglicol +Macrogol	Placa N°1	3,15mm	3,07mm	4,20mm	4,05mm
	Placa N°2	2,98mm		3,89mm	

Se observa que el grupo de Propilenglicol no evidenció inhibición del crecimiento bacteriano (promedio de halo de inhibición =0mm); mientras que el vehículo macrogol y la asociación de propilenglicol y macrogol evidenciaron halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Siendo el promedio de los halos de inhibición para el vehículo macrogol 4,11mm para *Enterococcus faecalis* y 5,89mm para *Fusobacterium nucleatum* y para la asociación de vehículos macrogol y propilenglicol 3,07mm para *Enterococcus faecalis* y 4,05mm para *Fusobacterium nucleatum*.

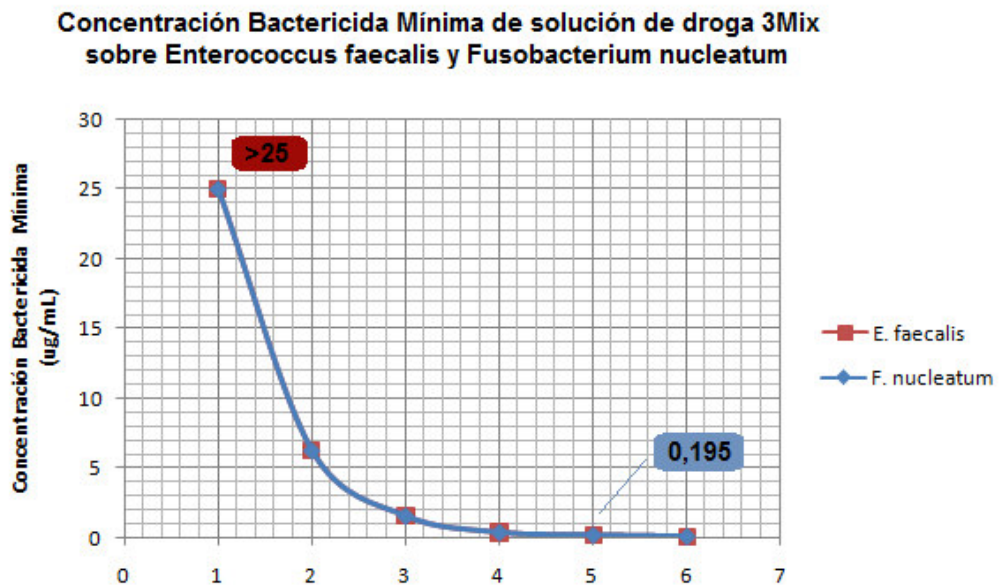
Encontramos que todos los grupos presentan un grado de sensibilidad Nula (halo de inhibición ≤ 8 mm). Es decir no existe efecto antibacteriano de los vehículos propilenglicol, macrogol y la asociación de los mismo sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Gráfico N°1.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



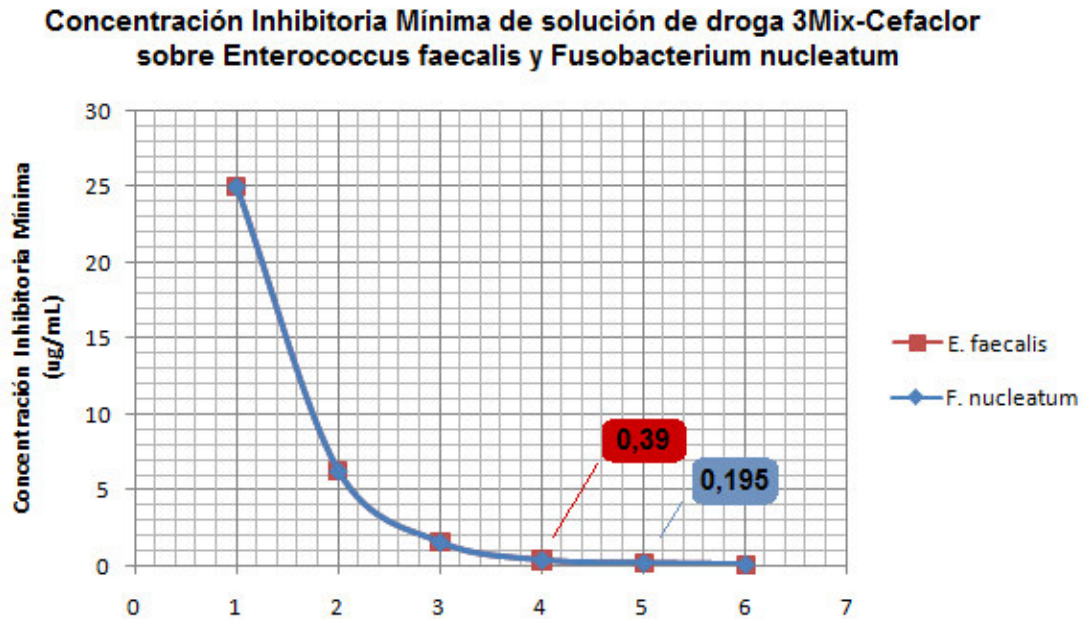
Se representa la CIM de solución de droga 3Mix para *Enterococcus faecalis* en 0,39µg/ml y para *Fusobacterium nucleatum* 0,195µg/ml. Dichas concentraciones impiden el crecimiento bacteriano.

Gráfico N°2.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



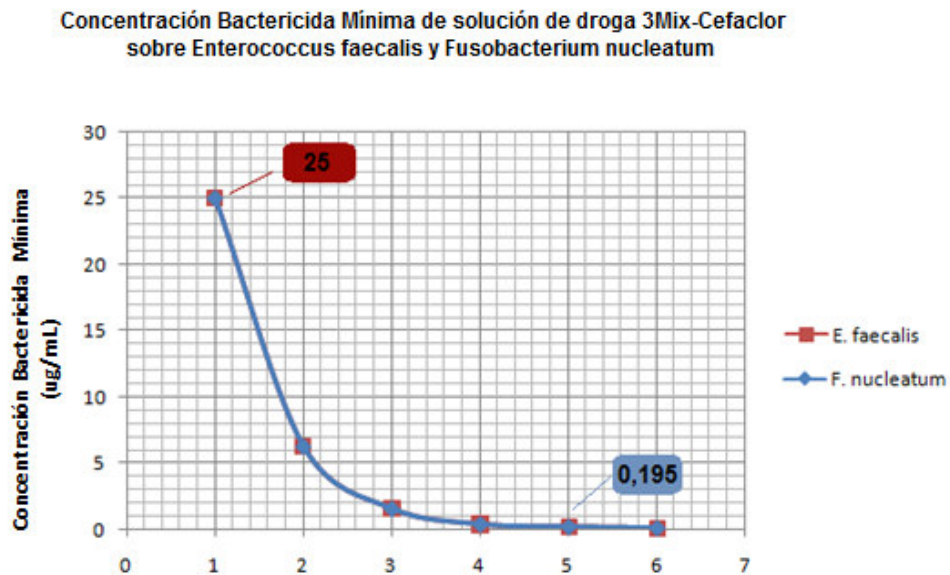
Se representa la CBM de solución de droga 3Mix para *Fusobacterium nucleatum* en 0,195µg/ml y para *Enterococcus faecalis* >25µg/ml. Dichas concentraciones son las mínimas requeridas para matar al 99,9% de las cepas.

Gráfico N°3.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix-Cefaclor sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



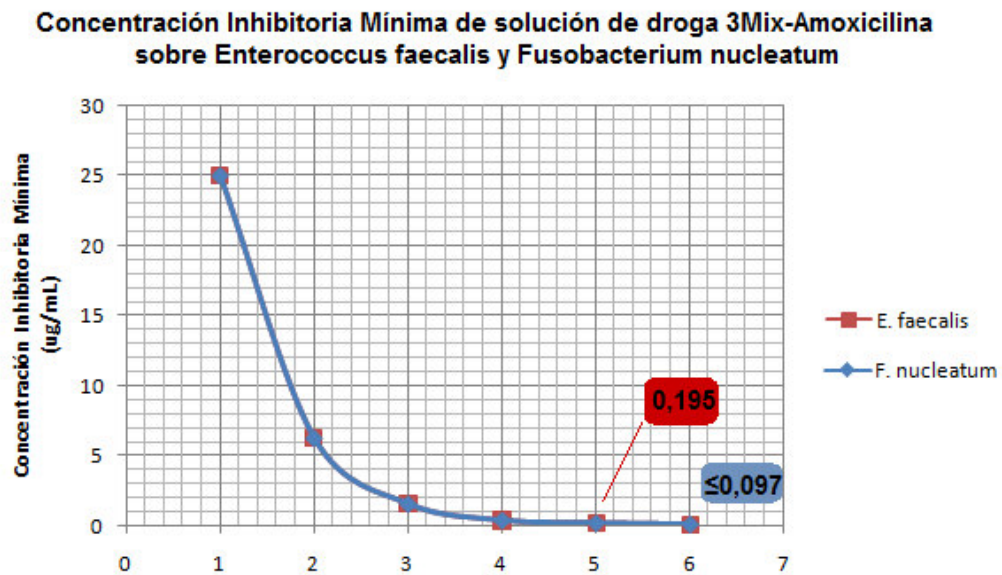
Se representa la CIM de solución de droga 3Mix-Cefaclor para *Enterococcus faecalis* en 0,39µg/ml y para *Fusobacterium nucleatum* 0,195µg/ml. Dichas concentraciones impiden el crecimiento bacteriano.

Gráfico N°4.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix-Cefaclor sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



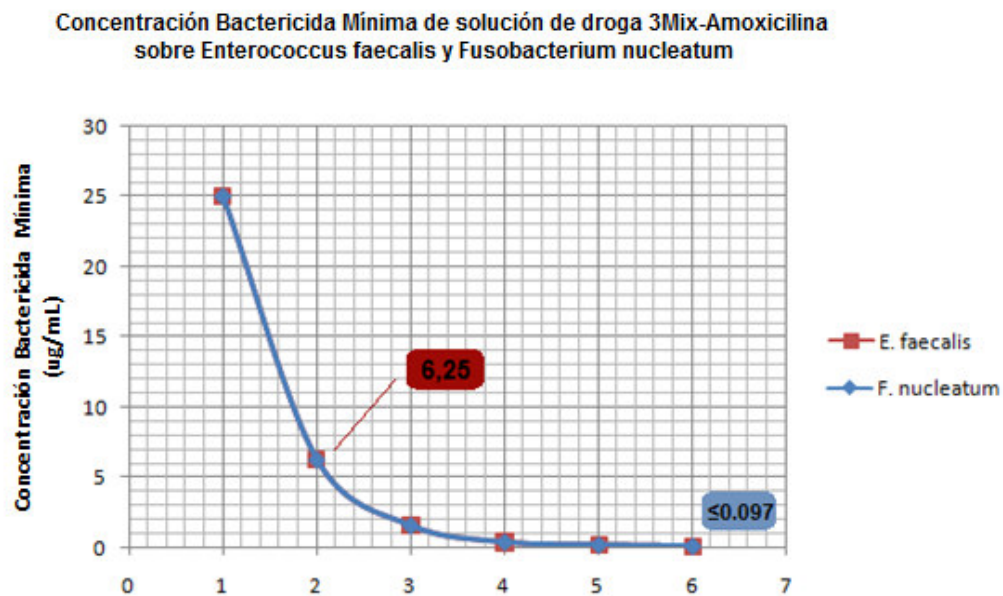
Se representa la CBM de solución de droga 3Mix-Cefaclor para *Enterococcus faecalis* es 25µg/ml y para *Fusobacterium nucleatum* 0,195µg/ml. Dichas concentraciones son las mínimas requeridas para matar al 99,9% de las cepas.

Gráfico N°5.- Concentración inhibitoria mínima de droga 3Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



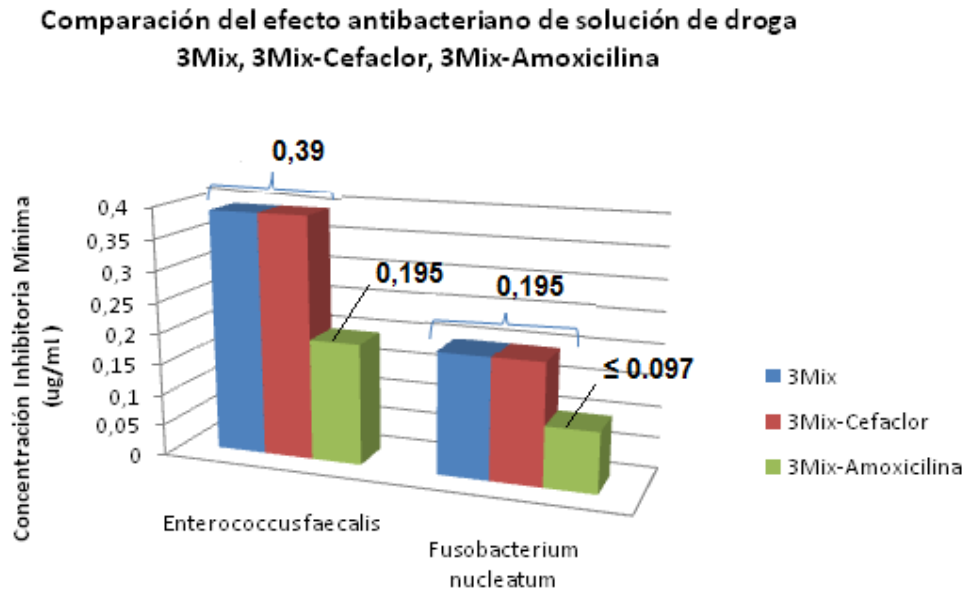
Se representa la CIM de solución de droga 3Mix-Amoxicilina para *Enterococcus faecalis* en 0,195µg/ml y para *Fusobacterium nucleatum* ≤0,097µg/ml. Dichas concentraciones impiden el crecimiento bacteriano.

Gráfico N°6.- Concentración bactericida mínima de droga 3Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



Se representa la CBM de solución de droga 3Mix-Amoxicilina para *Enterococcus faecalis* en 6,25µg/ml y para *Fusobacterium nucleatum* ≤0,097µg/ml. Dichas concentraciones son las mínimas requeridas para matar al 99,9% de las cepas.

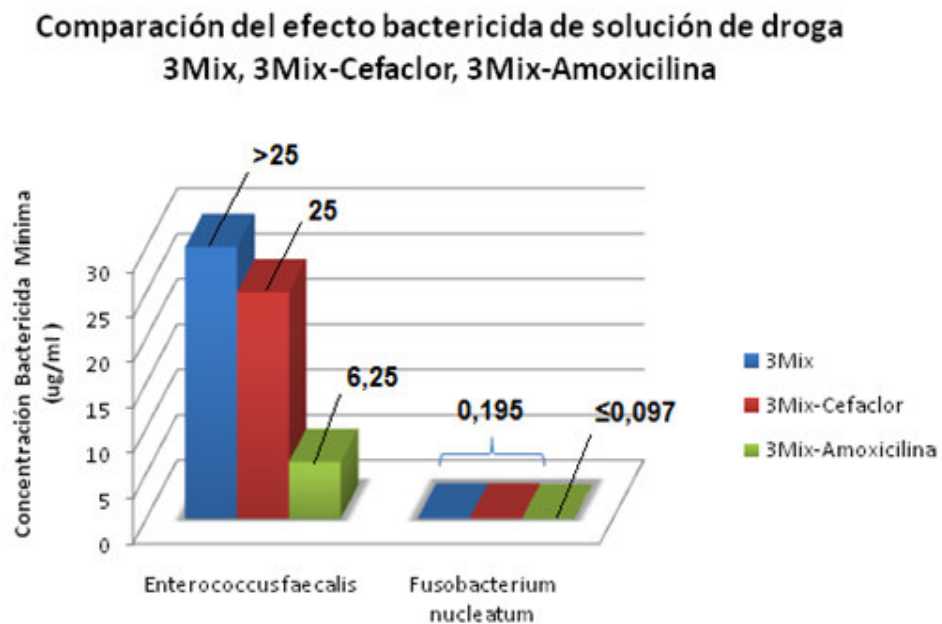
Gráfico N°7.- Comparación entre el efecto antibacteriano de droga 3Mix, 3 Mix-Cefaclor, 3 Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis*.



Se observa que de los 3 grupos de soluciones la solución de droga 3Mix-Amoxicilina fue la más efectiva contra ambas cepas estudiadas, ya que necesita menor concentración de la solución para inhibir el crecimiento, mientras que la solución de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor tuvieron un efecto similar, pero menor a la de la solución de droga 3Mix-Amoxicilina.

También se observa que el efecto de todas las soluciones de droga fue mejor para el grupo de *Fusobacterium nucleatum*, ya que requirieron menor concentración para inhibir su crecimiento.

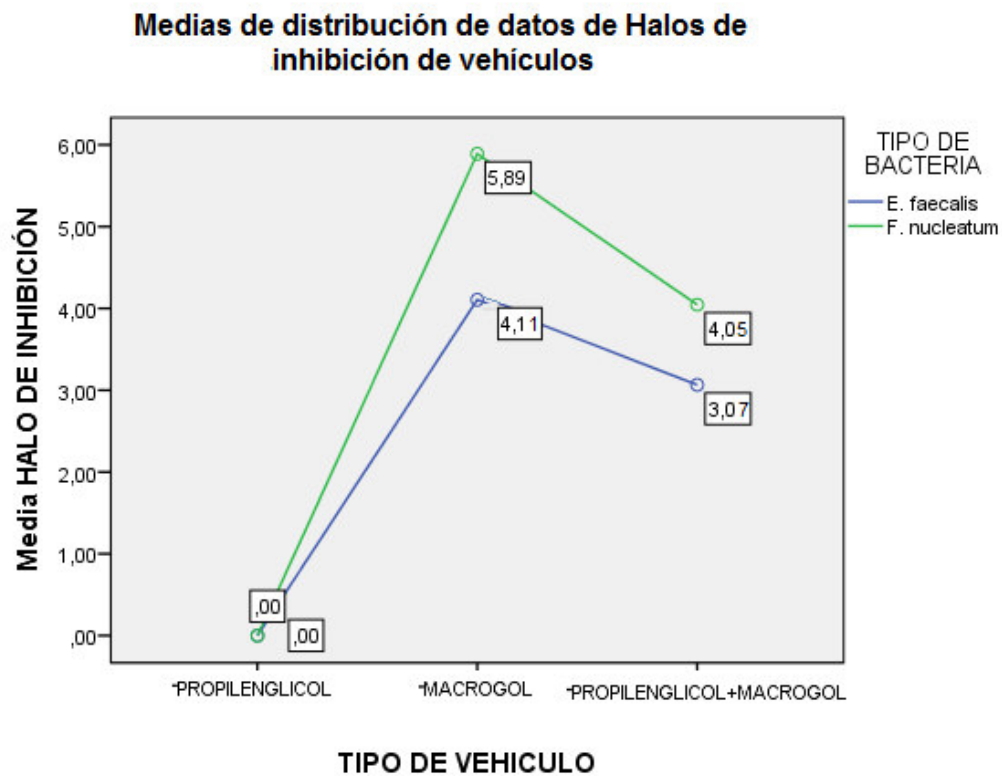
Gráfico N°8.- Comparación entre el efecto bactericida de droga 3Mix, 3 Mix-Cefaclor, 3 Mix-Amoxicilina sobre *Enterococcus faecalis*.



Se observa que de los 3 grupos de soluciones la solución de droga 3Mix-Amoxicilina tuvo mejor efecto bactericida para ambas cepas, ya que necesita menor concentración de solución para matar al 99,9% de bacterias.

Con relación a la sensibilidad de cada grupo bacteriano encontramos que el grupo de *Enterococcus faecalis* fue más difícil de eliminar, por eso observamos que se necesitó mayor concentración de las soluciones para matar a este grupo bacteriano.

Gráfico N°9.- Medias de distribución de datos de Halos de inhibición de vehículos Propilenglicol, Macrogol y Propilenglicol+Macrogol sobre *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.



Se ilustra la diferencia entre las medias de los halos de inhibición (mm.) según grupo bacteriano.

Observándose que el vehiculo de macrogol tiene mejor efecto antibacteriano que el vehículo de propilenglicol y la asociación de ambos. Obteniendo en segundo lugar a la combinación de macrogol y propilenglicol y al propilenglicol en último lugar.

VI. DISCUSIÓN

La terapia de revascularización ha surgido como una alternativa prometedora a la apexificación, estimulando el desarrollo radicular y reforzando las paredes de las raíces de dientes inmaduro por lo que la infección debe ser eliminada y el ecosistema microbiano debe interrumpirse sin el uso de remoción mecánica con el fin de preservar las células indiferenciadas o pluripotenciales y las paredes dentinales delgadas.

Investigaciones actuales realizadas por Nagata⁽¹⁹⁾(2014), Ordinola-Zapata⁽¹⁰⁾(2013), Adl⁽¹⁴⁾(2012) nos han dado a conocer los géneros y especies bacterianas más prevalentes en infecciones de dientes permanentes inmaduros con ápice abierto y en fracasos endodónticos, sin embargo son pocas las investigaciones sobre identificación y aislamiento de microorganismos prevalentes en conductos radiculares necróticos de dientes permanentes inmaduros con ápice abierto.

La presente investigación trabajó con los géneros *Fusobacterium nucleatum* y *Enterococcus faecalis*, el primero como representativo de la microbiota de dientes permanentes inmaduros con ápice abierto y la segunda como representativo de las infecciones resistentes a tratamientos apicales.

Se han propuesto una variedad de protocolos de desinfección. El presente estudio utilizó la combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina. Mostrando claramente que la combinación de droga 3Mix-Amoxicilina fue más efectiva que la combinación de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor en ambas cepas estudiadas ya que presentó menor concentración inhibitoria mínima (CIM) y menor concentración bactericida mínima (CBM), mientras que la combinación de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor tuvieron un efecto similar contra *Fusobacterium nucleatum* al tener las mismas CIM y CBM y para el caso de *Enterococcus faecalis* la combinación de

droga 3Mix-Cefaclor fue relativamente superior que la combinación de droga 3Mix ya que presentó menor valor en CBM; sin embargo todas las combinaciones fueron efectivas contra las cepas estudiadas debido a que sus concentraciones inhibitorias mínimas se encuentran por debajo del punto crítico de resistencia microbiológica publicados en las directices de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).⁽⁷⁰⁾

Para el caso de *Enterococcus faecalis*, el presente estudio obtuvo una CIM de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor en 0,39µg/ml y 0,195µg/ml para droga 3Mix-Amoxicilina, que fueron inferiores al descrito por la CLSI⁽⁷⁰⁾ ya que para bacterias gram positivas la CIM según CLSI⁽⁷⁰⁾ es 8µg/ml para ciprofloxacino, 8µg/ml para metronidazol, 8µg/ml para minociclina, 8µg/ml para cefaclor y 8µg/ml para amoxicilina. Los resultados se pueden explicar basándonos en el mecanismo de acción de los fármacos. La amoxicilina, que es una penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la unión con las proteínas de unión a la penicilina (PBP) presentes en la pared celular bacteriana y activando autolisinas que degradan la pared celular, del mismo modo actúa el cefaclor al ser una cefalosporina de segunda generación. Por eso este tipo de antibióticos generalmente actúan como fármacos bactericidas, mientras que la minociclina inhibe la síntesis de proteínas, bloqueando la elongación polipeptídica en el ribosoma 30S y por su naturaleza es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro.⁽⁷¹⁾ Y para el caso de *Fusobacterium nucleatum* las CIM que encontramos fueron 0,195µg/ml para combinación de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor y valores inferiores o iguales a 0,097µg/ml para droga 3Mix-Amoxicilina, los cuales fueron también inferiores a los descritos por la CLSI.⁽⁷⁰⁾ Por todo esto podemos entender que las combinaciones alternativas de droga 3Mix obtuvieron mejores efectos antibacterianos que la combinación de droga 3Mix, ya que al presentar a la

minociclina en su composición y esta al ser un fármaco bacteriostático la acción antibacteriana se vio afectada, sin embargo igualmente fue efectiva.

Esta investigación encontró que a 0,39µg/ml de combinación de droga 3Mix fue la mínima concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, al igual con lo encontrado con Chuensombat ⁽²⁵⁾(2013), en su estudio in vitro de citotoxicidad y eficacia antibacteriana, que encontró que a una concentración de 0,39µg/ml de combinación de droga 3Mix es posible de erradicar significativamente la cantidad de bacterias presentes en dientes necróticos, además que a esta concentración causa una menor citotoxicidad a las células de la pulpa dental y papila apical, mientras que Hoshino⁽⁷⁾(1996), determinó que la combinación de droga 3Mix alcanza una eficacia antibacteriana a una concentración de 25µg/ml y Adl⁽¹⁴⁾(2012), encontró 77,5µg/ml como CIM de combinación 3Mix para *Enterococcus faecalis*, además de ser el medicamento más efectivo contra esta cepa.

Nuestro estudio encontró también que el grado de sensibilidad de vehículos contra las cepas estudiadas fue nula, no encontrando inhibición del crecimiento bacteriano del propilenglicol contra *Enterococcus faecalis* sin embargo Nalawade⁽⁷²⁾(2015), quien evaluó la actividad bactericida de diferentes vehículos, encontró que el propilenglicol tuvo efecto bactericida contra *Enterococcus faecalis* a una concentración de 25%. La diferencia para estos resultados posiblemente sean debido al diferente origen de los vehículos usados en el experimento o diferente número de cepa bacteriana y deferente método utilizado. Todo esto puede afectar a los resultados.

Pocos estudios, como el de Ruparel⁽⁶⁾(2012), evalúan el efecto de las pastas utilizadas en desinfección de conductos sobre células madre de la papila dental, resaltando que para obtener la consistencia de las pastas antibióticas utilizadas en la actividad clínica, la concentración de cada antibiótico debe ser alrededor de

1g/ml (proporción polvo:líquido), evidenciándose que se viene utilizando concentraciones excesivas de la combinación de droga 3Mix, lo cual conlleva a dañar al tejido pulpar vital remanente, células madres y deteriorar la cicatrización de los tejidos y la regeneración. Existe mucha diversidad en los resultados obtenidos en los diferentes estudios de los efectos de las drogas, sin embargo la concentración de la combinación exacta de la droga empleada en la actividad clínica, como la de la revascularización pulpar y otros tratamientos de endodónticos como pulpotomías, pulpectomías, no se ha definido hasta ahora.

El presente trabajo encontró que con una concentración de 0,39µg/ml y 0,195µg/ml de droga 3Mix era posible inhibir las cepas estudiadas y >25µg/ml y 0,195µg/ml para eliminar completamente las bacterias, deduciendo que no es necesario utilizar tanta concentración de droga para erradicar las bacterias presentes en los conductos radiculares, ya que al usar la presentación de pasta necesitamos mucha concentración de antibiótico para lograr prepararlas, por eso una alternativa para hacer uso racional de los antibióticos podría ser incluir su uso en presentación de solución con el fin de evitar posibles mecanismos de resistencia bacteriana futura, además de no causar daños al tejido pulpar vital remanente, células madres presentes en la papila dental.

Por todo esto aún es necesario más información e investigación en esta área.

VII. CONCLUSIONES

- Existe efecto antibacteriano in vitro de la combinación de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor y 3Mix-Amoxicilina contra las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
- La Concentración Inhibitoria Mínima de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor, 3Mix-Amoxicilina fue 0,39µg/ml, 0,39µg/ml y 0,195µg/ml respectivamente sobre *Enterococcus faecalis*, mientras que sobre *Fusobacterium nucleatum* fue 0,195µg/ml, 0,195µg/ml y ≤0,097µg/ml respectivamente.
- La Concentración Bactericida Mínima de droga 3Mix, 3Mix-Cefaclor, 3Mix-Amoxicilina fue >25µg/ml, 25µg/ml y 6,25µg/ml respectivamente sobre *Enterococcus faecalis*, mientras que sobre *Fusobacterium nucleatum* fue 0,195µg/ml, 0,195µg/ml y ≤0,097µg/ml respectivamente.
- El grado de sensibilidad de los vehículos Propilenglicol, Macrogol y de su combinación fue nula contra *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum*.
- La combinación de droga 3Mix-Amoxicilina tuvo mejor efecto antibacteriano que la combinación de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor contra *Enterococcus faecalis*; mientras que el efecto antibacteriano de la combinación de droga 3Mix-cefaclor fue superior al de la combinación de droga 3Mix.
- La combinación de droga 3Mix-Amoxicilina tuvo mejor efecto antibacteriano que la combinación de droga 3Mix y 3Mix-Cefaclor contra *Fusobacterium nucleatum*; mientras que los efectos antibacterianos de estas dos últimas fueron similares.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la sensibilidad de la combinación de droga 3Mix y sus combinaciones alternativas en bacterias aisladas de pacientes con piezas permanentes jóvenes diagnosticadas clínica y radiográficamente con necrosis pulpar y/o periodontitis apical.
- Realizar estudios similares evaluando la eficacia de la combinación de droga 3Mix y sus combinaciones alternativas en las concentraciones determinadas en estudios In vivo.
- Realizar estudios comparando el efecto antibacteriano de las combinaciones alternativas y el grado de viabilidad celular de las células madres presentes en al papila dental.
- Realizar estudios de cromatografía para determinar la concentración exacta de la pasta 3 Mix-MP y de sus combinaciones alternativas.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Dabbagh B, Alvaro E, Vu D, Rizkallah J, Schwartz S. Clinical complications in the revascularization of Immature Necrotic Permanent Teeth. *Pediatric Dentistry*. 2012; 34(5): 414-417.
2. Trope M. Regenerative Potential of Dental Pulp. *Journal of endodontics*. 2008; 34(7S):13S-17S.
3. Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;45(1):17-2.
4. Taneja S, Kumari M, Parkash H. Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemp Clin Dent*. 2010;1(1):31-5.
5. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012;4(Suppl 2):S230-3.
6. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. 2012;38(10):1372-5.
7. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*. 1996;29(2):125-30.
8. Parasuraman VR, Muljibhai BS. 3Mix-MP in Endodontics—An overview. *Journal of Dental and Medical Sciences (JDMS) ISSN*. 2012:2279-0853.
9. Handajani J, Haniastuti T, Ohshima H, Hoshino E, Mada G. Survival of root canal pulp tissue after pulpitis. *J LSTR Ther*. 2010;9:1-6.

10. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J Endod*. 2013;39(1):115-8.
11. Namour M, Theys S. Pulp revascularization of immature permanent teeth: a review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:737503.
12. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30(4):196-200.
13. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the pliterature. *Aust Dent J*. 2010;55(4):446-52.
14. Adl A, Shojaee NS, Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Entrococcus Faecalis*. *Iran Endod J*. 2012;7(3):149-55.
15. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am*. 2010;54(2):313-24.
16. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001;17(4):185-7.
17. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009;42(1):84-92.
18. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue

- self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod.* 2012;38(1):91-4.
19. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod.* 2014;40(6):778-83.
 20. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent.* 2007;29(1):47-50.
 21. Ministerio de Salud. Prevalencia nacional de caries dental, fluorosis del esmalte y urgencia de tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años, Perú. 2001-2002. Informe de un Grupo Científico del MINSA. Perú: MINSA; 2005. Serie de Informes Técnicos de Investigación Epidemiológica: N° 05/050.
 22. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010;36(6):1086-91.
 23. Trairatvorakul C, Detsomboonrat P. Success rates of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline antibiotics used in the non-instrumentation endodontic treatment of mandibular primary molars with carious pulpal involvement. *Int J Paediatr Dent.* 2012;22(3):217-27.
 24. Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012;45(10):942-9.
 25. Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T. Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod.* 2013;39(6):813-9.

26. Prather B, Ehrlich Y, Spolnik K, Platt J, Yassen G. Effects of two combinations of triple antibiotic paste used in endodontic regeneration on root microhardness and chemical structure of radicular dentine. J Oral Sci. 2014;56(4):245-51.
27. Pashley D, Walton R, Slavkin H. Histología y Fisiología de la pulpa dental. En: Ingle J y Bakland L. Endodoncia. 5^{ta} ed. México DF: Mc Graw-Hill; 2004.p.25-55.
28. Gómez M y Campos A. Histología y Embriología Bucodental. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2001.
29. Ten Cate A. El complejo pulpodentinario. En: Histología Oral. Desarrollo, estructura y función. 2^{da} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986.p.191-235.
30. Luukko K, Kettunen P, Berggreen E. Estructura y funciones del complejo pulpodentinario. En: Cohen E, Hargreaves K. Vías de la pulpa. 10^{ma}ed. Madrid: Elsevier; 2011.p. 452-497.
31. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. Int Endod J. 2009;42(11):955-62.
32. Torabinejad M, Walton R. Biología de la pulpa y tejidos periapicales. En: Walton R, Torabinejad M. Endodoncia. Principios y Práctica Clínica. 4^{ta} ed. España: Elsevier; 2009.p. 8-29.
33. Soares I, Goldberg F. Tratamientos endodónticos conservadores. En: Soares I, Goldberg F. Endodoncia. Técnica y Fundamentos. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2002.p. 169-180.
34. Velásquez V, Alvarez M. Tratamiento pulpar en la apexificación del diente inmaduro mediante agregado de trióxido mineral. Odontología Sanmarquina. 2009;12(1):29-32.
35. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. Journal of endodontics. 2012;38(9):1293-

- 36.** Berman L, Hartwell G. Diagnóstico. En: Cohen E, Hargreaves K. Vías de la pulpa. 10^{ma}ed. Madrid: Elsevier; 2011. p. 36-38.
- 37.** Glendor U, Marcenes W, Andreasen J. Clasificación, Epidemiología y Etiología. En: Andreasen JO. Texto y atlas a color de lesiones traumáticas a las estructuras dentales. 4ta. ed.Caracas: Amolca; 2010. p. 217-253.
- 38.** Baumotte K, Bombana AC, Cai S. Microbiologic endodontic status of young traumatized tooth. Dent Traumatol. 2011;27(6):438-41.
- 39.** Huang GT. Apexification: the beginning of its end. Int Endod J. 2009;42(10):855-66.
- 40.** Trope M, Chivian N, Sigurdsson A. Papel de la endodoncia después de traumatismos dentales. En: Cohen E, Hargreaves K. Vías de la pulpa. 10^{ma}ed. Madrid: Elsevier; 2011. p.. 620-653.
- 41.** Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. Northwest Dent. 2007;86(3):33-5.
- 42.** Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. J Endod. 2010;36(3):536-41.
- 43.** American Association of Endodontists. Glossary. Contemporary Terminology for Endodontics Sixth edition. Chicago, 1998.
- 44.** Rafter M. Apexification: a review. Dent Traumatol. 2005;21(1):1-8.
- 45.** Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. J Dent. 2008;36(6):379-86.
- 46.** Karp J, Bryk J, Menke E, McTigue D. The complete endodontic obturation of an avulsed immature permanent incisor with mineral trioxide aggregate: a case report. Pediatr Dent. 2006;28(3):273-8.
- 47.** Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. J Endod. 2000;26(5):288-91.
- 48.** Apaydin ES, Shabahang S, Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. J Endod. 2004;30(1):21-4.

49. Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. *J Endod.* 2005;31(2):117-9.
50. Maroto M, Barberia E, Planells P, Vera V. Treatment of a non-vital immature incisor with mineral trioxide aggregate (MTA). *Dent Traumatol.* 2003;19(3):165-9.
51. Kerekes K, Heide S, Jacobsen I. Follow-up examination of endodontic treatment in traumatized juvenile incisors. *J Endod.* 1980;6(9):744-8.
52. Geisler TM. Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. *Dent Clin North Am.* 2012;56(3):603-26.
53. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:324-53.
54. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod.* 2015;41(2):146-54.
55. American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. En: Reunión de la American Association of Endodontists: American Association of Endodontists; 2015.
56. Ji YM, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung PH. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(6):1823-33.
57. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.* 1996;29(2):118-24.
58. Windley W, 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.* 2005;31(6):439-43.
59. Salcedo Moncada Doris. Efecto Antibacteriano de las Pastas 3 Mix-MP y Calen PMCC en un biofilm de Tres Bacterias Predominantes en

Periodontitis Apical Crónica. Tesis para optar el Grado Académico de Doctor en Estomatología. Lima. Perú. 2015

60. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? J Endod. 2008;34(7 Suppl):S51-6.
61. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Paradigm lost: a perspective on the design and interpretation of regenerative endodontic research. J Endod. 2014;40(4 Suppl):S65-9.
62. Jabarifar E, Khalighinejad N, Khademi AA, Razavi SM, Birjandi N, Badrian H, et al. Histologic evaluation of apical pulp of immature apex following extraction, surface treatment, and replantation in different storage media in dogs. Dent Traumatol. 2015;31(2):118-24.
63. Wikilengua.org [Sede Web]*. Terminesp: wikilengua.org; 2008-[actualizado el 7 de noviembre del 2008; acceso 03 de marzo del 2015]. Disponible en: <http://www.wikilengua.org>
64. Negroni M. Pruebas de susceptibilidad in vitro a los agentes antimicrobianos. En: Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 2da Edición. Argentina: Panamericana EM; 2009. 543-50.
65. Rae.es [Sede Web]*. España: Real Academia Española; 2012-[actualizada 2012; acceso 17 de setiembre del 2015]. Disponible en: <http://lema.rae.es>
66. Hoshino E. Information on LSTR therapy [Sede Web]*. Tokyo:lstr.jp; 2009-[actualizada 7 de julio del 2015; acceso 17 de setiembre del 2015]. Disponible en: <http://www.lstr.jp/e/information.html>
67. Muñante Cardenas José Luis. Identificación de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos frecuentes en necrosis pulpar. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Lima. Peru. 2005.

- 68.** Olarte A. Microbiología endodóntica. Revista de la Facultad de Ciencias de Salud. 2004. 1(1): 39-44.
- 69.** Duraffourd C, D'hervicourt L, La praz J. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. París: Masson SA; 1983.
- 70.** Institute CaLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. In: Institute CaLS, editor. Wayne USA2013.
- 71.** Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología médica. 6ª edición. Barcelona:Elsevier; 2009.
- 72.** Nalawade TM, Bhat K, Sogi SH. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. J Int Soc Prev Community Dent. 2015;5(2):114-9

X. ANEXOS

ANEXO N°1
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°1

Ficha N°

Fecha:

**TABLA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE
LA COMBINACION DE DROGA 3 MIX Y SUS COMBINACIONES
ALTERNATIVAS SOBRE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM***

CONCENTRACIÓN	INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO					
	3Mix		3 MIX CEFACLOR		3 MIX AMOXICILINA	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
25 µg/ml						
6,2 µg/ml						
1,56 µg/ml						
0,39 µg/ml						
0,195 µg/ml						
0,097 µg/ml						

**TABLA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO
BACTERIANO DE LA COMBINACION DE
DROGA 3 MIX Y SUS COMBINACIONES
ALTERNATIVAS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

CONCENTRACIÓN	INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO					
	3Mix		3 MIX CEFACLOR		3 MIX AMOXICILINA	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
25 µg/ml						
6,2 µg/ml						
1,56 µg/ml						
0,39 µg/ml						
0,195 µg/ml						
0,097 µg/ml						

ANEXO N°2
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS N°2

Ficha N°

Fecha:

**TABLA DE PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION DE
VEHÍCULOS SOBRE *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

HALO DE INHIBICIÓN					
PROPILENGLICOL		MACROGOL		PROPILENGLICOL+MACROGOL	
Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2

**TABLA DE PRESENCIA DE HALO DE INHIBICION DE
VEHÍCULOS SOBRE *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM***

HALO DE INHIBICIÓN					
PROPILENGLICOL		MACROGOL		PROPILENGLICOL+MACROGOL	
Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2

Anexo N°3

Procedimiento de obtención de drogas



Solutos: Antibióticos de la marca Sigma-Aldrich®, St Louis, MO

Solventes: agua estéril y alcohol de 92,8°

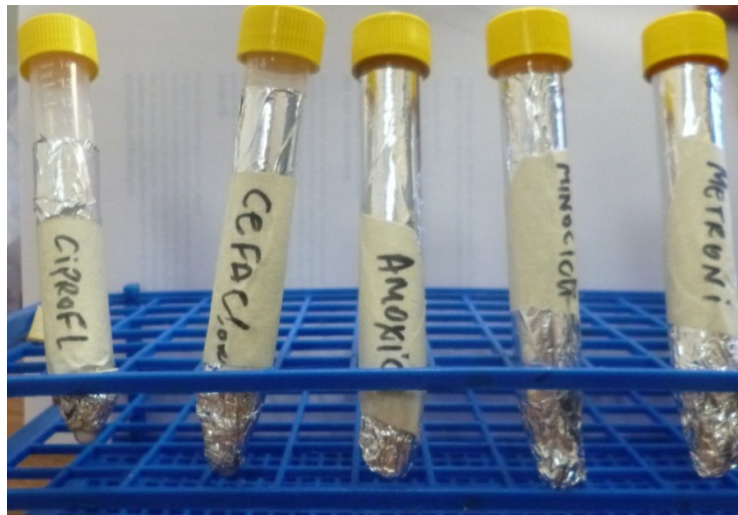


Peso exacto de solutos con balanza electrónica de precisión (Marte®, 0.001g, Brasil)

Homogenización con agitador shaker vórtex (Benchmark®, 200-3200 rpm, USA).



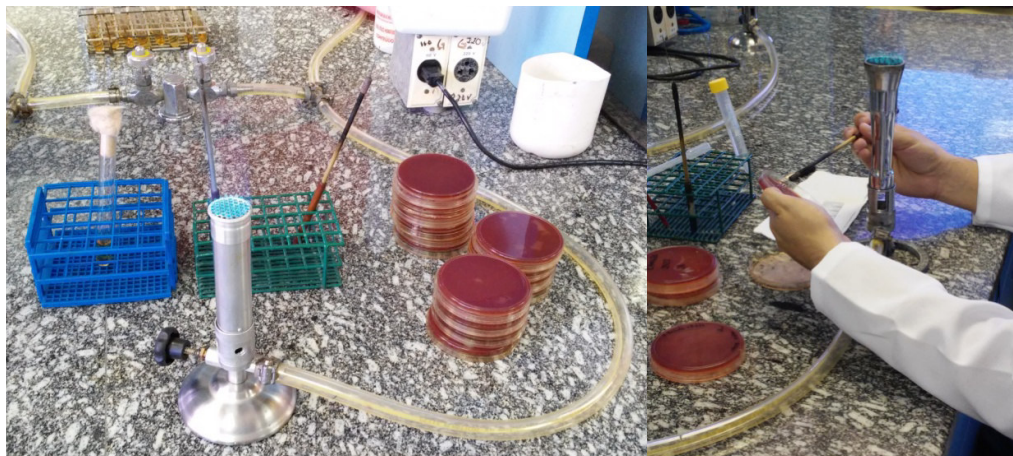
**Soluciones de cada
antibiótico a
concentración de 1mg/ml**



Propilenglicol (Adeka®, Japan)

**Macrogol (Polietilenglicol
400+4000, Sanyo Chemical®,
Japan)**

Anexo N°4
Obtención de material biológico

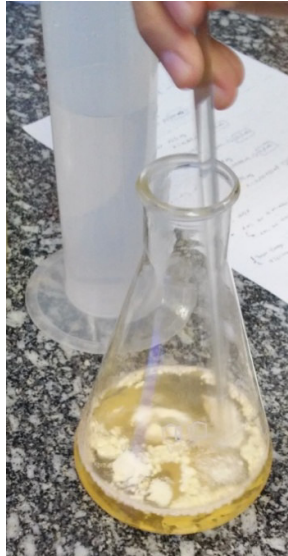


Reactivación de cepas bacterianas estándares ATCC (American Type Culture Collection)
***Fusobacterium nucleatum* ATCC® 25586**
***Enterococcus faecalis* ATCC® 29212**



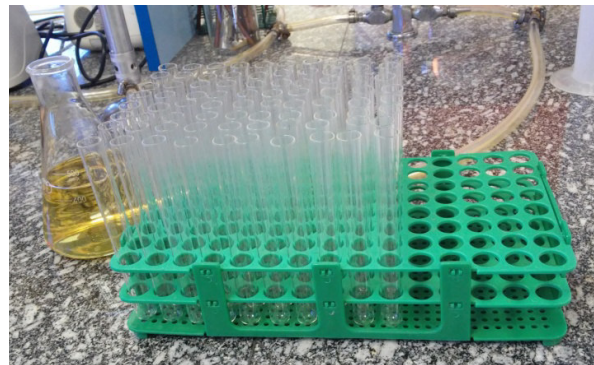
Generación de condiciones de anaerobiosis con motor
Megavac Vacuum Pump (Cenco®, 0.125 HP, USA), nitrógeno comprimido
(Gama Gases®, UN 1066 nitrógeno comprimido, 2.2, Brasil) y mixtura de gases
(Gama Gases®, UN 1956- 90%nitrógeno+10%co₂, Brasil).

Anexo N°5
Preparación del medio de cultivo
(TSB)



**Tryptic Soy Broth (MERCK®, 500g, Alemania) +
extracto de levadura (OXOID®, 500g, UK) + agua
destilada**

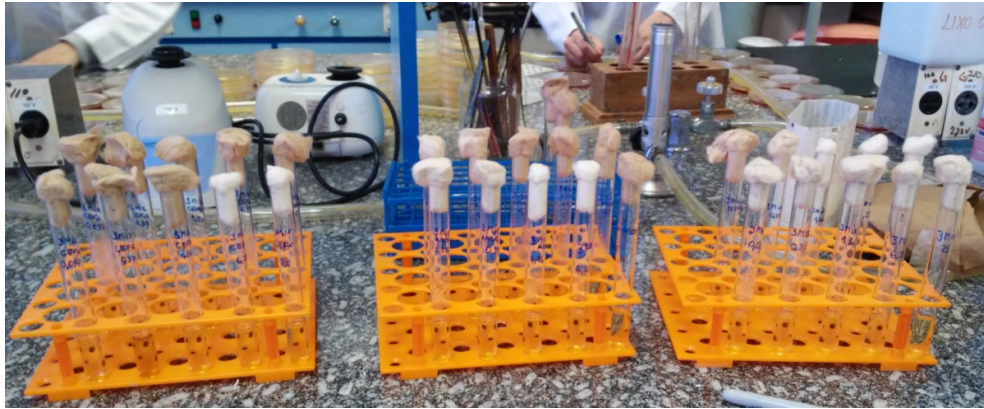
**Colocación de medio 5ml en cada
tubo**



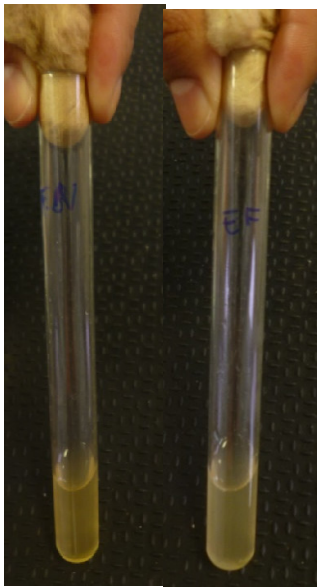
**Esterilización en
autoclave Fabbe-
Primar®, 70L, Brasil).**

Anexo N°6

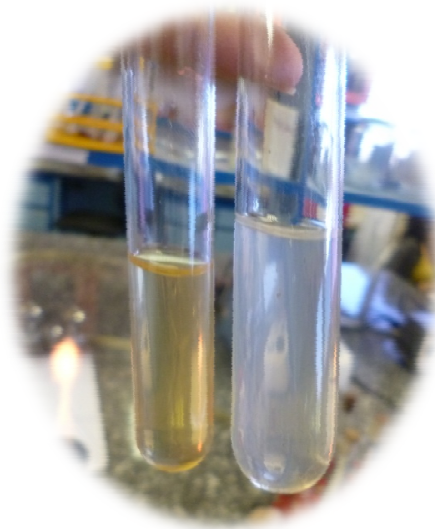
PROCEDIMIENTOS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA



Tubos con 5ml de medio de cultivo (TSB) organizados en los diferentes grupos



Cepas reactivadas en caldo BHI de *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatum* a una dilución de 0,5 en la escala turbimétrica de Mc Farland.



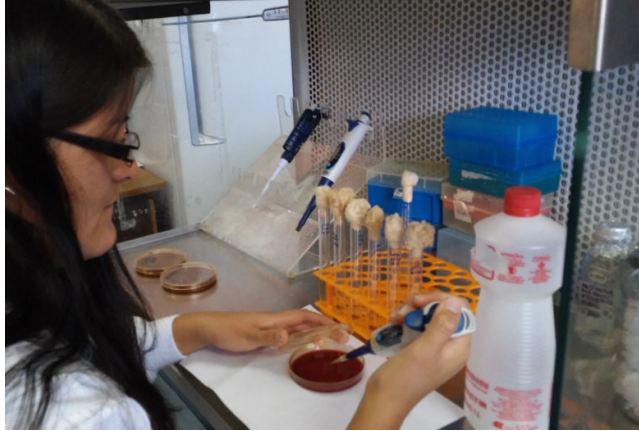
**Colocación de combinación de
drogas e Inoculación de las
cepas bacterianas en los
diferentes grupos**



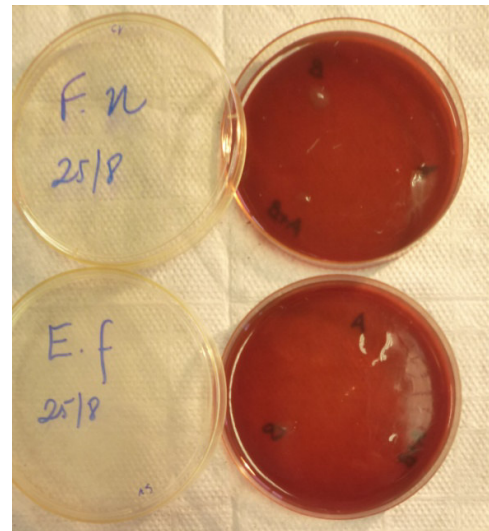
**Agrupación de muestras y
generación de condiciones de
anaerobiosis**

Anexo N°7

PROCEDIMIENTOS DE SUSCEPTIBILIDAD DE VEHÍCULO



**Colocación de drogas
en placas de agar
sangre para los
diferentes grupos
bacterianos**



Lectura final

